

# **Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Proteinadsorption an Primärpackmitteln**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

von  
**Fadwa Hussein**  
aus Bad Harzburg

1. Referent:	Prof. Dr. Rolf Daniels
2. Referent:	Prof. Dr. Hermann Wätzig
eingereicht am:	26.02.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am:	07.05.2007

Druckjahr 2007

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikation**

**Hussein, F. und Daniels, R.,** Improvement of an enzyme linked lectin assay to determine recombinant mistletoe lectin I, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 758-762

### **Tagungsbeiträge**

**Hussein, F. und Daniels, R.,** Influence of excipients and glass as a primary packaging material on the denaturation of lysozyme. (Poster), International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg (2004)

**Hussein, F. und Daniels, R.,** Bestimmung der Aktivität von Lysozym nach Lagerung in Primärpackmitteln mit Hilfe der Fluorimetrie (Poster), DPhG Jahrestagung und Joint Meeting, Regensburg (2004)

**Hussein, F. und Daniels, R.,** Optimierung eines ELLA (Enzyme-Linked-Lectin-Assay) Tests zur Bestimmung von Mistellektin I (Poster), DPhG Jahrestagung und Joint Meeting, Mainz (2005)

**Hussein, F. und Daniels, R.,** Influence of formulation variables and primary packaging materials on the denaturation and enzymatic activity of lysozyme (Poster), 5<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf (2006)



**Für meine lieben Eltern**



Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Daniels am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung während der Bearbeitung sowie für die freundliche Betreuung.

Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann danke ich für die netten Gespräche und die sehr freundliche Aufnahme an das Institut.

Herrn Prof. Dr. H. Wätzig danke ich sehr für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für das angenehme Arbeitsklima und die erhaltene fachliche Unterstützung und zahlreichen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei Kirsten Nebelung und Martha Vasquez-Borbe für die stets tatkräftige und ausdauernde Unterstützung bei zahlreichen CD-Untersuchungen. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Alexander Brämer und Andreas Düvel aus meinem ehemaligen Arbeitskreis für die ständige Diskussionsbereitschaft, die Motivation und die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Bei Herrn Dr. Berlin, Frau Ute Willig und ganz besonders bei Frau Christiane Mollenschott vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig bedanke ich mich für die stets persönliche und freundliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung, eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und vor allem für die Möglichkeit, Untersuchungen durchzuführen.

Herrn Koller von der Firma Schott Schweiz AG in St. Gallen danke ich sehr herzlich für die großzügige Überlassung von Untersuchungsbehältnissen und die stets freundliche Hilfe.

Ferner möchte ich den im Material und Methoden-Teil aufgeführten Firmen für die Überlassung von Untersuchungsmaterialien danken.

Mein aller größter und ganz besonderer Dank gilt meiner Schwester Riem und Luma Baydoun für die kritische und sehr hilfreiche Durchsicht der Arbeit, das Mut machen und die persönliche Unterstützung während und nach unserer gemeinsamen Tätigkeit am Institut und meinem Bruder Fadi dafür, dass er mir bei vielen Fragen immer hilfsbereit zur Seite stand.

Speziell möchte ich mich auch bei meinen besten Freunden Kader Aygün und Manuel Windmann bedanken, die mir während der ganzen Zeit motivierend zur Seite standen.

Mit besonderem Ausdruck möchte ich auch meinen Eltern danken, die mir die Möglichkeit für meine Ausbildung gegeben haben und mich dabei immer sehr unterstützt und begleitet haben.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Proteine.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Struktur und Funktion .....	3
2.1.2	Faltung.....	8
2.1.3	Stabilität.....	11
2.1.4	Adsorption.....	12
2.1.5	Lysozym .....	20
2.1.6	Mistellektin .....	23
2.1.6.1	Struktur des rekombinanten Mistellektins I .....	24
2.1.6.2	Herstellung von rekombinantem Mistellektin .....	27
2.1.6.3	Wirkungsmechanismus.....	27
<b>2.2</b>	<b>Analytik von Proteinen.....</b>	<b>28</b>
2.2.1	Circulardichroismus .....	28
2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford .....	32
2.2.3	Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA).....	32
<b>2.3</b>	<b>Primärpackmittel für Proteinformulierungen .....</b>	<b>34</b>
2.3.1	Glas .....	34
2.3.1.1	Struktur .....	34
2.3.1.2	Chemische Eigenschaften.....	35
2.3.1.3	Hydrolytische Resistenz.....	36
2.3.1.4	Beschichtete Glasoberflächen .....	37
2.3.2	Kunststoffe .....	38
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>40</b>
3.1.1	Proteine .....	40
3.1.2	Hilfsstoffe.....	40
3.1.3	Primärpackmittelmaterialeien.....	42

<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Herstellung der Proteinlösungen .....	45
3.2.2 Lagerung der Proteinlösungen .....	45
3.2.3 Circular dichroismus (CD) .....	45
3.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford .....	45
3.2.5 Aktivitätsbestimmung von Lysozym .....	46
3.2.6 Herstellung von rekombinantem Mistellektin I .....	47
3.2.7 Aktivitätsbestimmung von rML I mittels Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA) .....	47
3.2.7.1 Plattenvorbereitung .....	47
3.2.7.2 Probenvorbereitung .....	48
3.2.7.3 Versuchsdurchführung .....	48
3.2.8 Bestimmung der Carbohydratbindungsspezifität des Mistellektins .....	48
3.2.9 Hemmtest und Testselektivität .....	49
3.2.10 Verbesserung des Enzyme Linked Lectin Assays .....	49
3.2.10.1 Bestimmung der Bindungsspezifität von rML .....	50
3.2.10.2 Hemmtest und Testselektivität .....	51
3.2.10.3 Zusammenfassung Hemmtest und Testselektivität .....	53
3.2.11 pH-Wert-Bestimmung .....	54
3.2.12 Berechnung der Ionenstärke .....	54
3.2.13 Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) –Spektroskopie .....	55
3.2.13.1 Probenvorbereitung .....	55
3.2.13.2 Messung .....	56
3.2.13.3 Auswertung .....	56
<b>4 Versuchsergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Einfluss von Primärpackmitteln .....</b>	<b>59</b>
4.1.1 Wasser .....	59
4.1.1.1 Bestimmung der Adsorption .....	59
4.1.1.2 Bestimmung der Konformation .....	59
4.1.1.3 Bestimmung der Aktivität .....	59
4.1.2 Ionenstärke .....	61

4.1.2.1	Bestimmung der Adsorption .....	61
4.1.2.2	Bestimmung der Konformation .....	62
4.1.2.3	Bestimmung der Aktivität .....	63
4.1.2.4	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit verschiedenen Primärpackmitteln .....	64
<b>4.2</b>	<b>Oberflächenmaterialien .....</b>	<b>66</b>
4.2.1	Wässrige Lysozymbösungen .....	66
4.2.1.1	Rein wässrige Lösung .....	66
4.2.1.2	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse mit Wasser als Lösungsmittel .....	68
4.2.1.3	Einfluss des pH-Wertes .....	70
4.2.1.4	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit verschiedenen pH-Werten .....	78
4.2.1.5	Einfluss der Ionenstärke.....	82
4.2.1.6	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit verschiedenen Ionenstärken .....	88
4.2.2	Grenzflächenaktive Hilfsstoffe .....	91
4.2.2.1	Polysorbat 80 .....	91
4.2.2.2	Poloxamer 407 .....	95
4.2.2.3	Polyvinylpyrrolidon.....	97
4.2.2.4	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit grenzflächenaktiven Hilfsstoffen.....	99
4.2.3	Einfluss der Proteinkonzentration .....	102
4.2.3.1	Rein wässrige Systeme .....	102
4.2.3.2	Natriumchlorid 0,45 % .....	107
4.2.3.3	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Einfluss der Proteinkonzentration .....	110
<b>4.3</b>	<b>Anwendung der FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Konformation ausgewählter Systeme mit Lysozym .....</b>	<b>112</b>
4.3.1	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit der FTIR-Spektroskopie.....	113

---

<b>4.4</b>	<b>Untersuchung von rekombinantem Mistellektin (rML)</b>	<b>114</b>
4.4.1	Untersuchung der Konformationsänderung des rML	114
4.4.1.1	Einfluss der Oberfläche und der Konzentration	114
4.4.2	Aktivitäts- und Konzentrationsbestimmung von rML	115
4.4.2.1	Zusammenfassende Bewertung des Primärpackmitteleinflusses auf die Konformation und Aktivität von rML	117
<b>5</b>	<b>Abschlussdiskussion</b>	<b>118</b>
<b>5.1</b>	<b>Einfluss der Proteinkonzentration</b>	<b>119</b>
<b>5.2</b>	<b>Milieubedingungen</b>	<b>119</b>
<b>5.3</b>	<b>Grenzflächenaktive Hilfsstoffe</b>	<b>121</b>
<b>5.4</b>	<b>Fazit</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>136</b>

# 1 Einleitung und Problemstellung

Biotechnologisch gewonnene Proteine haben in den letzten Jahren in der Pharmakotherapie an Popularität gewonnen. Vor allem als Adjuvans bei schweren Krankheiten, wie z.B. Krebs, sind große Erfolge erzielt worden [Hajto et al. 1989].

Die komplexe Struktur der Proteine ist für die Entwicklung geeigneter Arzneiformulierungen eine große Herausforderung. Da Proteine praktisch nicht oral bioverfügbar sind, ist nur eine parenterale Applikation möglich [Zimmer 2003]. Neben gefriergetrockneten Pulvern zur Herstellung von Parenteralia sind auch flüssige Zubereitungen auf dem Markt [Rote Liste 2006]. Jedoch werden Proteine in Lösung durch verschiedene Reaktionen in ihrer Stabilität beeinflusst, und es kommt so zu einer Strukturveränderung des Moleküls [Manning et al. 1989, Nakanishi et al. 2001]. Verglichen mit konventionellen chemischen Wirkstoffen besitzen Proteine als Makromoleküle zahlreiche Stellen am Peptidgrundgerüst, die für Abbaureaktionen anfällig sind [Manning et al. 1989, Zimmer 2003, Schumacher et al. 2003]. Aufgrund ihrer komplexen Struktur neigen sie auch zu intensiven Wechselwirkungen mit den für eine geeignete Applikationsform notwendigen Primärpackmitteloberflächen, wie z.B. Glas. Proteine sind stark grenzflächenaktiv und so in der Lage, bei ihrer Herstellung und anschließenden Lagerung an der Oberfläche von Behältnissen zu adsorbieren. Hochpotente Proteinwirkstoffe werden in sehr geringen Konzentrationen (Nano- oder Mikrogrammbereich) eingesetzt. Die Adsorption eines Proteins an Primärpackmitteloberflächen und eine anschließende Denaturierung führen dazu, dass die zur Verfügung stehende Wirkstoffkonzentration sinkt und so eine richtige Dosierung unmöglich gemacht wird [Manning et al. 1989, Horbett 1992, Nakanishi et al. 2001]. Außerdem ist die korrekte Konformation des Proteins nötig, um die erforderliche biologische Aktivität des Arzneistoffes zu gewährleisten. Nur wenn das Molekül in seiner Gesamtstruktur unversehrt ist, kann der Proteinarzneistoff auch uneingeschränkt seine therapeutische Funktion erzielen.

Sowohl die primäre adsorptive Wechselwirkung zwischen proteinogenen Wirkstoffen und Primärpackmitteloberflächen als auch die sekundäre Destabilisierung durch Entfaltung führen dazu, dass die verfügbare Konzentration an aktivem Wirkstoff im Laufe der Lagerung weiter abnimmt.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist, den Einfluss verschiedener Primärpackmittel auf die Adsorption, Konformation und Aktivität von Proteinen zu charakterisieren. Dabei werden auch der Einfluss des pH-Wertes, der Ionenstärke sowie weitere Hilfsstoffe untersucht, mit dem Ziel, eine optimale PPM/Protein/Hilfsstoff-Kombination zu identifizieren.

Als Modellprotein wird Lysozym verwendet, dessen Strukturveränderung in wässrigen Lösungen nach Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln mit Hilfe des Circular dichroismus (CD) gezeigt wird [Hamaguchi und Ikeda 1972, Tanaka et al. 1975, Wefle 1996, Kelly et al. 2005]. Außerdem wird bestimmt, ob Lysozym bei Konformationsänderungen bzw. während der Lagerung seine Konzentration und spezifische Aktivität beibehält.

Ausgehend von dem Modellprotein Lysozym werden weitere Versuche mit bereits auf dem Arzneimittelmarkt befindlichem rekombinanten Mistellektin durchgeführt, das als Adjuvans in der Krebstherapie eingesetzt wird. Da dieser Arzneistoff bei seiner Herstellung und weiteren Verarbeitung eine starke Adsorptionsneigung an verschiedenen Oberflächen zeigt, dient es als interessantes Protein zur Bewertung des Einflusses verschiedener Hilfsstoffe auf die Verringerung der Adsorption.

Neben der Untersuchung von möglichen Konformations- und Konzentrationsänderungen während der Lagerung in verschiedenen PPM mit Hilfe des CD und des Enzyme Linked Lectin Assays (ELLA), wird eine Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze dieses Testverfahrens angestrebt.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Proteine

#### 2.1.1 Struktur und Funktion

Der Begriff Protein, griech.: Proteios (erstrangig), wurde 1836 von Jöns J. Berzelius geprägt. Proteine, auch Eiweiße genannt, sind eine Gruppe sehr wichtiger hochmolekularer organischer Makromoleküle, die zu den Grundbausteinen allen Lebenszellen gehören. Chemisch sind Proteine Polypeptide. Jede Zelle besitzt eine große Anzahl verschiedener Proteine, wobei ihre biologischen Funktionsweisen äußerst vielfältig sind. Als Strukturproteine bestimmen sie den Aufbau von Zellen, Enzyme katalysieren chemische Reaktionen, Antikörper dienen der Infektionsabwehr, als Carrierproteine übernehmen sie den Transport spezifischer Substanzen, und als Rezeptoren sind sie in die Signaltransduktion eingebaut [Karlson et al. 1994].

Die Bausteine der Proteine sind die proteinogenen (proteinaufbauenden) Aminosäuren (AS), die durch Peptidbindungen – Säureamid-Bindungen – miteinander verbunden sind. Es gibt 20 verschiedene Aminosäuren, die entweder basisch oder sauer sind und sich weiterhin in ihrer Polarität unterscheiden. Somit geben Aminosäuren den Proteinen einen amphoteren und amphiphilen Charakter. Die Reihenfolge der einzelnen AS, die Aminosäuresequenz oder auch Primärstruktur genannt, folgt keiner Gesetzmäßigkeit, sondern ist in jeder Kombination möglich. Neben Proteinen wie der Ribonuklease, die ausschließlich aus Aminosäuren bestehen, gibt es Proteine, die zusätzlich mit einem Nicht-Proteinanteil, der prosthetischen Gruppe, verbunden sind. Diese Proteinkomplexe werden je nach Natur dieser zusätzlichen Einheit in drei Klassen eingeteilt: Glykoproteine enthalten eine Zuckergruppe, Metalloproteine ein spezielles Metall und Lipoproteine ein Lipid als Komplexpartner.

Der Aufbau der Proteine und die Anordnung ihrer räumlichen Struktur erfolgt in der Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Die Primärstruktur eines Proteins ist charakterisiert durch die lineare Abfolge seiner Aminosäuren, ohne Berücksichtigung der Seitenketten, die nach dem Peptidprinzip miteinander verknüpft sind. Linus Pauling und Robert Corey (1951 a) führten zahlreiche Röntgenbeugungsuntersuchungen an Aminosäuren und Dipeptiden mit dem Ziel durch, die Konformation der Polypeptidkette aufzuklären. Diese Studien zeigten, dass die Peptidgruppe eine starre, planare Struktur aufweist, die durch die Mesomerie zwischen folgenden Grenzzuständen bedingt ist (siehe Abbildung 2-1):

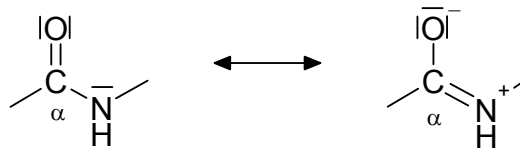


Abbildung 2-1: Mesomere Formen einer Peptidbindung.

Diese Grenzzustände, die in Abbildung 2-1 dargestellt sind, geben der Peptidbindung einen partiellen Doppelbindungscharakter [Karlson et al. 1994].

Die Hauptkette der Proteine besteht aus den Atomen, die an der Bildung der Peptidbindung beteiligt sind. Die Seitenketten der Aminosäurereste werden hierbei nicht berücksichtigt, d.h. diese Hauptkette kann als eine Abfolge miteinander verknüpfter starrer Peptidgruppen betrachtet werden. Die Konformation dieses Rückgrates kann durch ihre Bindungswinkel um die  $C_{\alpha}$ -C- ( $\psi$ ) und die  $C_{\alpha}$ -N- ( $\phi$ ) Bindung jedes Restes beschrieben werden. Der konformative Freiraum und daher die Bindungswinkel des Peptidgerüsts sind sterisch eingeschränkt.

Zwei Elemente der Sekundärstruktur sind so weit verbreitet, dass sie auch in Proteinen mit unterschiedlichen AS-Sequenzen sofort zu erkennen sind. Es handelt sich dabei um die  $\alpha$ -Helix und das  $\beta$ -Faltblatt. Beide Strukturen sind durch eine maximale Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonyl- (CO) und Aminogruppen (NH) der Peptidbindungen und durch eine minimale sterische Abstoßung sehr stabil. Die helikale Struktur ist die einfachste Anordnung der Polypeptidkette. Sie wurde 1951 von Linus Pauling entdeckt [Pauling et al. 1951 b] und als  $\alpha$ -Helix bezeichnet. Bei dieser Struktur ist die Polypeptidkette schraubenförmig (rechtsdrehend) um einen Zylinder gewickelt und besitzt so eine stabförmige Gestalt. Die  $\alpha$ -Helix besitzt durchschnittlich 3,6 Aminosäuren pro Windung, wobei alle benachbarten Windungen über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind und der Helix eine zusätzliche Stabilität verleihen. Die Steigung, d.h. die Entfernung von einer Windung zur nächsten, beträgt 0,54 nm. Die  $\alpha$ -Helices von Proteinen haben eine durchschnittliche Länge von 12 AS-Resten, was ca. 3 helikalen Windungen und einer Länge von ca. 18 Å entspricht. Die Wasserstoffbrückenbindungen der Peptidbindungen zwischen den CO- und NH-Bindungen stehen sich von Windung zu Windung entlang der Schraubenachse in einem optimalen Abstand von 2,8 Å gegenüber, was die hohe Stabilität innerhalb dieser Sekundärstruktur erklärt. Die Seitenketten der Aminosäuren zeigen nach außen, um sterische Interaktionen untereinander und mit dem Peptidgerüst zu vermeiden. Der Drehsinn der Helix kann theoretisch im Uhrzeigersinn (rechts) oder entgegengesetzt sein. Allerdings findet man in Proteinen nur rechtsgängige  $\alpha$ -Helices, da die linksgängige Helix, obwohl sterisch erlaubt, energetisch weniger begünstigt ist [Stryer 1990, Lehninger et al. 2001].



Ebenfalls 1951, postulierten Pauling und Corey die Existenz einer zweiten Sekundärstruktur, das  $\beta$ -Faltblatt. Wie bei der  $\alpha$ -Helix ist beim  $\beta$ -Faltblatt die gesamte Kapazität an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Polypeptidgrundgerüsts ausgelastet. Allerdings treten diese Bindungen beim Faltblatt zwischen zwei benachbarten Proteinketten auf und nicht – wie bei der Helix – innerhalb einer Kette, so dass das Gerüst der Polypeptidkette in einer gestreckten Ziehharmonika-Form vorliegt. Die Peptidbindungen liegen dabei in einer starren Ebene, die Seitenketten stehen abwechselnd nahezu senkrecht nach oben und unten aus der Faltungsebene heraus.  $\beta$ -Faltblätter können als paralleles oder anti-paralleles Faltblatt vorkommen. Beim anti-parallelen  $\beta$ -Faltblatt verlaufen die benachbarten Polypeptidketten in entgegengesetzter Richtung (Amino- bzw. Carboxyterminus in entgegengesetzter Richtung), beim parallelen dagegen in der gleichen Richtung.

Beide Sekundärstrukturen werden optimal durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidstickstoffen und den Carbonylsauerstoffen des Polypeptidgrundgerüsts stabilisiert. Welche Sekundärstruktur innerhalb eines Proteins ausgebildet wird, hängt von der Aminosäurezusammensetzung, also der Primärstruktur und somit von der relativen Position der jeweiligen AS ab.

Früher wurden Proteine bei der Betrachtung der gesamten Proteinmorphologie in globuläre oder fibrilläre Proteine eingeteilt. Zu der Gruppe der globulären (kugelförmigen) Proteine (Sphäroproteine) zählen diejenigen Proteine, deren Polypeptidketten in annähernd kugelförmiger Form gefaltet sind. Die Ketten der fibrillären Proteine, auch Faser- oder Skleroproteine genannt, sind in langen Strängen angeordnet. Beispiele für die letzte Gruppe von Proteinen sind das Kollagen und Keratin. Diese Einteilung ist jedoch seit der Entdeckung der  $\alpha$ -Helix und des  $\beta$ -Faltblattes wieder etwas in den Hintergrund getreten, da Proteine, die sowohl globuläre als auch fibrilläre Einheiten besitzen, nicht eindeutig klassifiziert werden können.

Bei den Faserproteinen Kollagen und Keratin ist nur ein Typ Sekundärstruktur dominierend. Bei diesen beiden Beispielen sind mehrere Polypeptidketten zu superhelikalen Strukturen zusammengelagert, die wiederum zu größeren Bündeln zusammengesetzt sind und somit mehr Festigkeit erlangen. Dadurch sind fibrilläre Proteine in der Lage, in Lebewesen eine Stützfunktion auszuführen.

Die Mehrheit der Proteine, v.a. Enzyme und Peptidhormone, sind globuläre Proteine. Die Strukturen globulärer Proteine sind sehr komplex, da sie mehrere Sekundärstrukturtypen in einer Polypeptidkette enthalten. Neben den regelmäßig aufgebauten Strukturen der  $\alpha$ -Helix und des  $\beta$ -Faltblattes können auch uneinheitliche Strukturen in Proteinen einen wesentlichen Anteil an der Proteinstruktur ausmachen. Die  $\alpha$ -Helix und das  $\beta$ -Faltblatt bestehen aus gleichen, sich wiederholenden  $\psi$ - und  $\phi$ - Werten. Abschnitte der Polypeptidkette, deren benach-

barte Reste nicht die gleichen bzw. ähnliche  $\psi$ - und  $\phi$ - Werte besitzen, werden als uneinheitliche Strukturen oder random coil bezeichnet.

Die Abschnitte der  $\alpha$ -Helix und des  $\beta$ -Faltblattes sind üblicherweise mit Polypeptidketten verbunden, die abrupt ihre Richtung ändern und so die kompakte globuläre Gestalt der Proteine ermöglichen. Dieses Strukturprinzip konnte mit Hilfe von Strukturuntersuchungen ermittelt werden. Diese sogenannten Haarnadel- oder auch  $\beta$ -Schleifen verbinden häufig  $\beta$ -Faltblätter, die antiparallel angeordnet sind. Die plötzliche Richtungsänderung der Polypeptidkette findet dann statt, wenn eine CO-Gruppe des Restes  $n$  mit der NH-Gruppe des  $n+3$ -Restes eine Wasserstoffbrückenbindung eingeht [Stryer 1990].

Die Hauptsekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt treten in globulären Proteinen in unterschiedlichem Ausmaß und verschiedenen Kombinationen auf. Einige Proteine bestehen nur aus  $\alpha$ -Helices (z.B. Hämoglobin, Myoglobin), die durch kurze Links miteinander verknüpft sind. Andere haben einen großen Anteil an  $\beta$ -Faltblattelementen ohne  $\alpha$ -Helix (z.B. Concanavalin A). Die meisten Proteine jedoch besitzen wesentliche Anteile beider Sekundärstrukturen (z.B. Lysozym) [Stryer 1990, Strynadka und James 1996].

Die Tertiärstruktur eines Proteins legt die dreidimensionale Lage aller Atome einschließlich seiner Seitenketten fest. Die bereits bekannten Proteinstrukturen wurden durch kristallographische Röntgenstrukturanalyse oder durch zweidimensionale kernmagnetische Resonanzverfahren (2D-NMR) ermittelt. Diese tertiäre Strukturform wird innerhalb des Proteinmoleküls durch verschiedene Bindungskräfte stabilisiert. Neben Wasserstoffbrückenbindungen spielt die Disulfidbindung eine sehr wichtige Rolle, die durch Dehydrierung von zwei HS-Gruppen zweier Cysteinreste entsteht. Außerdem treten ionische, d.h. zwischen geladenen Gruppen der Seitenkette, und hydrophobe Wechselwirkungen, zwischen Kohlenwasserstoffgruppen im Inneren der Proteine, auf. Unpolare Aminosäuren wie Valin, Leucin oder Isoleucin befinden sich meist im Proteininneren, die auf diese Weise nicht mit Wasser in Berührung kommen. Die hydrophoben Effekte, die diese Verteilung begünstigen, sind in hohem Maße für die dreidimensionale Struktur nativer Proteine verantwortlich. Geladene und polare Seitenketten, wie z.B. Arginin, Histidin oder Lysin, die ionische Wechselwirkungen eingehen können, sind üblicherweise an der Proteinoberfläche lokalisiert. Ungeladene polare Aminosäuren, wie Serin, Threonin oder Asparagin, treten meistens auch an der Proteinoberfläche auf, können aber auch im Inneren des Moleküls vorkommen. Sie sind dann durch Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Resten verknüpft. Das Innere eines Proteins ist daher meist hydrophob und der äußere Bereich vorwiegend hydrophil.

Polypeptidketten, die mehr als 200 Aminosäuren enthalten, falten sich üblicherweise in zwei oder mehrere globuläre Cluster, die als Domänen bezeichnet werden. Darunter wird ein Abschnitt der Peptidkette verstanden, der sich unabhängig von anderen Bereichen innerhalb

des Proteins zu einer stabilen Tertiärstruktur falten kann. Einzelne Domänen innerhalb eines Proteins werden nur durch kurze Polypeptidsegmente miteinander verbunden. Infolgedessen sind die meisten Domänen strukturell unabhängige Einheiten, die als Aneinanderreihung einzelner globulärer Proteine erscheinen. Der Aufbau des Proteins in einzelnen Domänen ist aber nicht immer offensichtlich zu erkennen. Mehrere Einheiten können miteinander so in Wechselwirkung treten, dass das Protein nach außen hin als ein einheitliches, kugelförmiges Gebilde erscheint. Die meisten Domänen bestehen aus 100 bis 200 Aminosäureresten und haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 25 Å.

Bei der Betrachtung verschiedener Proteinstrukturen ist erkennbar, dass Domänen aus zwei oder mehr Sekundärstrukturabschnitten bestehen. Der Grund dafür ist, dass mindestens zwei Domänen nötig sind, um einen hydrophoben Kern innerhalb des Moleküls von der wässrigen Umgebung abzuschirmen. Domänen besitzen häufig die spezifische Funktion, kleine Moleküle zu binden. Dabei befindet sich die katalytische Bindungsstelle in einer Spalte zwischen den Domänen. In diesem Fall erlaubt die relativ biegsame Gelenkregion eine flexible Interaktion zwischen Protein und gebundenem Molekül.

Die meisten Proteine, insbesondere die, die Molekularmassen über 100 kDa besitzen, bestehen aus mehreren Polypeptidketten. Diese sogenannten Untereinheiten, die nicht immer identisch sein müssen, stehen in einer bestimmten Geometrie miteinander in Verbindung. Diese räumliche Anordnung der Proteinuntereinheiten wird als Quartärstruktur der Proteine bezeichnet. Durch die starken Wechselwirkungen der Einheiten untereinander kann die Konformationsänderung einer Untereinheit auch eine Änderung bei den anderen hervorrufen, was als Kooperativität bezeichnet wird. Das Hämoglobin besteht aus vier Untereinheiten. Bindet ein Sauerstoffmolekül an eine Untereinheit, ist die Bindung eines weiteren Moleküls deutlich erleichtert. Dieser Effekt wird nur durch Konformationsänderungen innerhalb der Untereinheiten ermöglicht.

Zusammenfassend sind alle vier Strukturen in Abbildung 2-2 veranschaulicht:

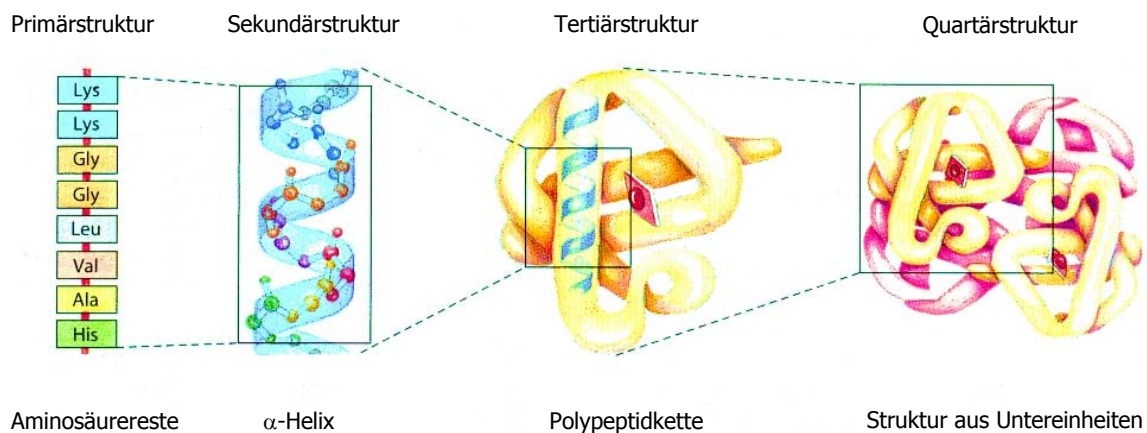


Abbildung 2-2: Darstellung der vier Strukturebenen von Proteinen [aus Stryer 1990].

### 2.1.2 Faltung

Gefaltet wird die Peptidkette im Anschluss an die Biosynthese an den Ribosomen. Während oder nach der Synthese legt sich die Aminosäurekette in eine definierte räumliche Struktur. Unterstützt wird die Proteinfaltung durch „Faltungshelfer“. Es handelt sich dabei um Proteine, sog. Chaperone, die entweder an nicht-nativen Strukturen binden oder die Faltungsgeschwindigkeit forcieren. Fehler im Faltungsvorgang können zu einer großen Anzahl von Erkrankungen wie BSE führen [Zubay 2000]. Neben Faltungsfehlern ist seit langem bekannt, dass es auch Reaktionen gibt, die dem üblichen Faltungsmechanismus Konkurrenz machen und unlösliche Proteinaggregate entstehen lassen. Bei der Alzheimer Erkrankung kommt es zur pathologischen Aggregation von Amyloidfibrillen im Gehirn, was dort zu einer Verkümmern von Zellen führt [Friedhoff et al. 1998].

Die Struktur nativer Proteine wird vorwiegend von hydrophoben Effekten und zu einem geringeren Teil durch Wechselwirkungen zwischen polaren Resten beherrscht. Die native Konformation ist sehr gut definiert und kann durch Röntgenuntersuchungen oder NMR-Spektroskopie ermittelt werden. Entfaltete Proteine hingegen besitzen die Möglichkeit zur Bildung vieler unterschiedlicher Konformationen, die durch Drehung der  $\psi$ - und  $\phi$ -Bindungswinkel des Peptidgrundgerüsts entstehen [Mirsky und Pauling 1936]. Den Faltungsmechanismus zu erklären, wird aus diesem Grunde ziemlich erschwert.

Der Verlust der spezifischen Eigenschaften des Proteins [Mirsky und Pauling 1936], welche nur der nativen Form zugeschrieben werden können, resultiert durch den Verlust an nativer Struktur. Proteine können durch Temperaturerhöhung, pH-Wert-Änderung oder durch den Einfluss chemischer Reagenzien (z.B. Harnstoff) denaturiert werden. Die Folge ist eine Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Moleküls und somit der Tertiär-

struktur, was dem Protein nun die Möglichkeit bietet, eine große Anzahl an verschiedenen anderen Konformationen einzunehmen. Durch extreme Veränderung des pH-Wertes ändert sich die Ladungsverteilung des Proteins so stark, dass eine elektrostatische Abstoßung zu einer Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen führt. Schon eine geringe Erhöhung der Temperatur verändert die Eigenschaften des Proteins, wie die UV-Absorption, optische Drehung oder die Viskosität, die empfindlich von der spezifischen Konformation des Proteins abhängig sind. Chemische Reagenzien verbessern die Löslichkeit nicht-polarer Substanzen in Wasser und zerstören somit die hydrophoben Wechselwirkung im Protein, die für dessen Stabilisierung zuständig sind. Für jedes Protein sind andere Bedingungen zur Denaturierung nötig. Der Vorgang der Denaturierung kann allerdings auch reversibel sein, solange es nicht zu einer Spaltung der kovalenten Bindungen innerhalb des Moleküls kommt. Das Protein ist in diesem Fall in der Lage, seine native Konformation wiederzuerlangen, wenn die Umgebungsbedingungen so gewählt werden, dass die ursprüngliche Konformation wieder stabilisiert werden kann. Dieses Phänomen wird als Renaturierung bezeichnet und wurde 1957 von Christian Anfinsen aufgeklärt [Sela und Anfinsen 1957]. Anfinsen demonstrierte mit seinen Versuchen, dass sich Proteine unter physiologischen Bedingungen spontan in ihre native Konformation falten, was voraussetzt, dass die Primärstruktur die dreidimensionale Proteinstruktur vorschreibt.

Kristallformen nativer Proteine sind charakteristisch für jedes Protein. Es ist bis heute nicht gelungen, Kristalle von denaturierten Proteinen zu gewinnen, um Röntgenstrukturuntersuchungen durchzuführen. Das Phänomen der möglichen verschiedenen Konformationen aufgrund der Denaturierung wird durch die Beobachtung gestützt, dass denaturierte Proteine eine sehr viel höhere Entropie besitzen als native. Diese große Entropiedifferenz ist nicht durch kleine Änderungen der Bindungswinkel und Schwingungen innerhalb des Moleküls zu erklären, sondern kann nur aufgrund des Erscheinens verschiedener Konformationen möglich sein, was in einer Änderung des nativen Proteins in einen wenig spezifizierten Zustand begründet liegt.

Studien über die Proteinstabilität und Renaturierung legen nahe, dass Proteinfaltung durch die Aminosäurereste bestimmt wird, die sich im Inneren des gefalteten Proteins befinden. Viele Proteine falten sich in wenigen Sekunden auf direktem Wege mit teilgefalteten Zwischenstufen in ihre native Struktur und nicht durch die Ausbildung zufälliger Konformationen. Wenn sich ein Protein faltet, steigt seine konformative Stabilität stark an, seine freie Energie sinkt stark ab, was dazu führt, dass sich der Faltungsprozess nur auf eine bestimmte Weise vollziehen kann.

Experimentelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Proteinfaltung mit der Formierung von Sekundärstrukturabschnitten,  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt, beginnt. Diese frühe Stufe der Proteinfaltung erfolgt sehr schnell, in sehr kleinen Proteinen bereits innerhalb von 5 ms nach Beginn. Da native Proteine einen dichten hydrophoben Kern besitzen, ist es wahrscheinlich, dass die Triebkraft der Faltung in wässriger Lösung die Zusammenlagerung der hydrophoben Aminosäuren zu diesem Kern darstellt. Dadurch wird der Teil an hydrophoben Seitenketten an der Oberfläche der Proteine auf ein Minimum verringert, und die stabilisierenden hydrophoben Wechselwirkungen im Inneren werden maximal erhöht. Ein mögliches Faltungsintermediat, das stabil genug ist, um identifiziert zu werden und dass sich bei pH-Wertveränderungen einiger Proteine ereignen kann, wird als molten-globule-Struktur bezeichnet [Fink et al. 1994]. Es besitzt einen hohen Anteil an nativer Sekundärstruktur, aber nur wenig von seiner Tertiärstruktur. In diesem Zustand liegen die hydrophoben Seitenketten schon im Inneren des Proteins und besitzen noch eine hohe Beweglichkeit. Anschließend wird die Sekundärstruktur stabilisiert, und die tertiäre Struktur beginnt sich auszuprägen. In dieser Zwischenphase können schon native Elemente in Form von Subdomänen entstehen, die noch nicht richtig angelegt sind, um Domänen auszubilden. Im letzten Teil der Faltung werden die Sekundärstrukturen zu Ende gebildet und das Protein erreicht seine relativ starre Anordnung: Hydrophobe Seitenketten im Inneren, hydrophile Ketten außen und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Die restlichen Wassermoleküle werden dabei aus dem hydrophoben Kern verdrängt. [Fischer 1996]. Abbildung 2-3 zeigt den möglichen Verlauf einer Proteinfaltung [Stryer 1990]. Die Faltung der Proteinhauptkette ist nicht symmetrisch und erfolgt nicht auf zufälligem Wege. Die Ausrichtung der Aminosäureseitenketten folgt allerdings einem Grundsatz. Das Proteininnere ist fast komplett hydrophob, das Äußere hauptsächlich aus polaren, aber auch unpolaren Resten.

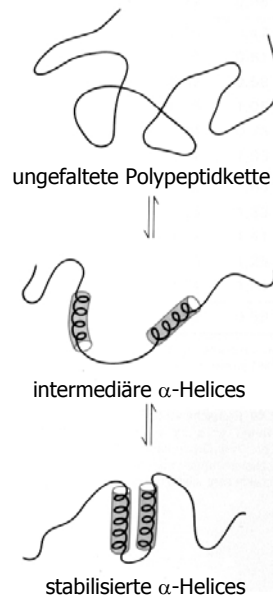


Abbildung 2-3: Schema der Proteinfaltung. Zwei Bereiche der ungefalteten Peptidkette nehmen vorübergehend  $\alpha$ -Helix-Gestalt an, die dann durch Ausbildung eines Komplexes zwischen diesen Segmenten stabilisiert werden.

### 2.1.3 Stabilität

Der Anteil rekombinant hergestellter Arzneimittel unter den jährlich neu eingeführten Wirkstoffen betrug 2005 mittlerweile 15 – 25 % [Verband Forschender Arzneimittelhersteller 2006, Food and Drug Administration 2006]. Für diese Gruppe stellt das Entwickeln geeigneter Formulierungen eine große Herausforderung dar, da die komplexe Proteinstruktur sehr anfällig für Abbaureaktionen ist. Ihre schlechte orale Bioverfügbarkeit lässt nur eine parenterale Applikationsform zu [Zimmer 2003]. Neben Pulvern zur Herstellung von Parenteralia sind auch flüssige Zubereitungen auf dem Markt [Rote Liste 2006]. Proteine werden in Lösung in ihrer Stabilität durch verschiedene Reaktionen beeinflusst. Diese können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die chemischen und physikalischen Instabilitätsreaktionen [Manning et al. 1989, Violand und Siegel 2000, Wang 2005]. Eine Zusammenfassung aller möglichen Reaktionen ist in Tabelle 2-1 dargestellt. Bei den chemischen Abbaureaktionen wie z.B. der Hydrolyse erfolgt eine Aufspaltung der chemischen Bindungen und anschließend eine Neubildung innerhalb des Moleküls. Dieses führt zu einer neuen Proteinstruktur. Zu den physikalischen Instabilitäten zählt z.B. die Adsorption. Hier kommt es zu einer Auffaltung des Proteins auf der Oberfläche und zu einer Änderung der Raumstruktur des Moleküls. Die Folge ist eine Verringerung der Proteinkonzentration und ein Wirksamkeitsverlust des Proteinwirkstoffes durch die räumliche Veränderung des Proteins [Manning et al. 1989, Nakanishi et al. 2001].

Tabelle 2-1: Übersicht über mögliche chemische und physikalische Instabilitätsreaktionen, die in Proteinarzneimitteln beobachtet werden.

<b>Chemische Instabilität</b>	<b>Physikalische Instabilität</b>
Deamidierung	Adsorption
Razematbildung	Denaturierung
Hydrolyse	Aggregation
Oxidation	Fällung
$\beta$ -Eliminierung	
Umlagerung der Disulfidbindung	

Durch alle in Tabelle 2-1 aufgeführten Instabilitätsreaktionen besteht für Proteinarzneimittel die Gefahr, dass diese nicht nur in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigt werden, sondern auch die Möglichkeiten der Nebenwirkungen für den Patienten stark erhöht sein können. Bei der Entwicklung und anschließenden Herstellung müssen daher alle möglichen Abbaureaktionen erkannt und durch den Einsatz geeigneter Hilfsstoffe vermindert werden [Wang 1999].

Exogene Einflüsse während der Produktion, Lagerung und dem Transport des proteinogenen Arzneimittels können Instabilitätsreaktionen auslösen. Für den Wirkstoff kritische Faktoren müssen im Vorfeld einzeln für jedes Protein untersucht werden. Wichtige Faktoren sind Art und Zusammensetzung des Lösungsmittels (pH-Wert und Hilfsstoffzusätze), Ionenstärke, Proteinkonzentration, Temperatur oder Grenzflächenphänomene [Wang 1999, Chi et al. 2003]. Die wichtigste Herausforderung für die Formulierung von Proteinarzneimitteln in Lösung ist die Erhaltung der biologischen Aktivität des Proteinwirkstoffes.

#### 2.1.4 Adsorption

Die Wechselwirkung von Proteinen mit verschiedenen Oberflächen ist ein Problem, das seit langem bekannt ist, das aber wiederum in biologischen Vorgängen ein unverzichtbares Phänomen darstellt. Wie bereits erwähnt haben Proteine aufgrund ihrer Größe, Flexibilität und ihres amphoteren Charakters stark oberflächenaktive Eigenschaften und adsorbieren an vielen verschiedenen Oberflächen in unterschiedlichem Maße. Adsorption ist der Versuch eines Moleküls, die freie Oberflächenenergie des Feststoffes, an den es adsorbiert, zu reduzieren [Nakanishi et al. 2001, Martin 2002]. Es ist schwieriger eine Adsorption von Proteinen zu



verhindern, als diese zu bewirken bzw. zu kontrollieren [Brash und Horbett 1995, Hlady und Buijs 1996].

Die Problematik dieses Verhaltens besteht darin, dass sich biologische Zellen, wie Bakterien, auf bereits adsorbierte Proteine anlagern. Dieser Effekt wird als *Biofouling* bezeichnet und führt z.B. in der Lebensmittelindustrie zu einer Destabilisierung von Lebensmittelemulsionen oder zu einer Trübung von Kontaktlinsen durch Lysozym. Die Ablagerung von Proteinen auf künstlichen Implantaten in der Humanmedizin ist höchst unerwünscht und stellt ein großes Problem dar. Eine besondere Rolle spielt dabei das für die Blutgerinnung des Menschen wichtige Protein Fibrinogen, dass bei Wunden für die Bildung des sekundären Thrombus verantwortlich ist. Die Thrombozyten adsorbieren an den Rändern und verschließen die Verletzung zusätzlich [Thews et al. 1999]. Da dieses physiologische Verhalten auch bei künstlichen Materialien, die mit dem Blutplasma in Kontakt stehen, ausgelöst wird, kann es zu lebensbedrohlichen Blutgerinnseln und Entzündungen bei den Patienten kommen. Das könnte der erste Schritt einer oberflächeninduzierten Thrombose sein [Andrade 1986]. Die Untersuchung der Biokompatibilität von Materialien durch Modifizierung der Oberflächen und eine daraus resultierende Nachahmung der Proteinadsorption sind daher aktuelle Probleme, mit denen sich viele Forschergruppen befassen [Norde 1986, Brash und Horbett 1995, Chi et al. 2003].

Proteinarzneistoffe sind bei der Verarbeitung oder ihrer Lagerung in Behältnissen vielen verschiedenen Glasoberflächen oder Kunststoffen ausgesetzt [Manning et al. 1989, Horbett 1992, Nakanishi et al. 2001]. Proteine gehen aufgrund ihrer hohen Oberflächenaktivität starke Wechselwirkungen mit diesen Materialien ein, welche zu einem Verlust ihrer funktionellen Eigenschaften durch oberflächeninduzierte Konformationsänderungen führen können. Die Primärstruktur und damit auch die dreidimensionale Struktur jedes Proteins sind unterschiedlich, so dass unterschiedliche Oberflächenaktivitäten resultieren. Folglich zeigen verschiedene Proteinarzneistoffe auch verschiedene Wechselwirkungen mit den Oberflächen. Das Ausmaß dieser Oberflächenphänomene ist je nach Protein, Feststoffoberfläche und Umgebungsbedingungen unterschiedlich [Horbett 1992, Gray 2004]. Die grundlegenden Vorgänge einer Adsorption von Proteinen an festen Oberflächen sind bis heute aber noch nicht vollständig geklärt. Ziel der Forschung ist es, die Proteinadsorption vorhersagen, kontrollieren und manipulieren zu können.

Thermodynamische Wechselwirkungen, die an der Proteinadsorption beteiligt sind, wurden bereits durch Norde und Haynes (1995) beschrieben. Darin werden mitunter intermolekulare Interaktionen wie Coulomb- und van der Waals-Kräfte sowie elektrostatische Wechselwirkungen, aber auch entropiegesteuerte Effekte wie hydrophobe Wechselwirkungen oder Konformationsänderungen aufgezählt [Brash und Horbett 1995, Norde und Haynes 1995]. Zu-

sätzlich spielen intramolekulare Interaktionen innerhalb des Proteins für den Adsorptionsprozess eine wichtige Rolle. Es ist sehr schwierig, genau zu bestimmen, in welchem Ausmaß diese Konformationsänderungen auftreten und noch schwieriger, diese vorausszusagen. Eine genaue Theorie der Proteinadsorption konnte bis heute nicht aufgestellt werden. Dieses Thema basiert traditionell auf experimentellen und empirisch ermittelten Methoden. Die Untersuchung der Reaktionskinetik von Adsorptionsprozessen wird hier am häufigsten gewählt [Fang und Szleifer 2001]. Allerdings benötigt die Betrachtungsweise der Kinetik meistens ein spezielles Modell, auf das die erhaltenen Daten bezogen werden können. Da jedes Modell aber auf unabhängigem Weg überprüft werden müsste, sich aber jedes Protein in verschiedenen Umgebungsbedingungen unterschiedlich verhält, besteht hier eine große Schwierigkeit in der Interpretation [Hlady und Buijs 1996]. Die Auswertung experimenteller Adsorptionsstudien benötigt häufig die Anpassung an verschiedene Adsorptionsisothermenmodelle wie z.B. die klassische Langmuir-Theorie, die die Grundlage für die Gasadsorption an Feststoffen bildet [Martin 2002].

Die Proteinadsorption stellt einen dynamischen Prozess dar, da durch verschiedene in Lösung befindliche Moleküle ungleiche Diffusionsgeschwindigkeiten und somit eine Konkurrenzsituation bei der Adsorption an der Oberfläche resultieren. Folgende Schritte umfassen die Proteinadsorption:

1. Transport/ Diffusion in Richtung Grenzfläche/ Oberfläche
2. Bindung an die Grenzfläche/ Oberfläche
3. strukturelle Umlagerungen im adsorbierten Zustand des Proteins
4. Desorption von der Grenzfläche/ Oberfläche
5. Abtransport von der Grenzfläche/ Oberfläche

Die Diffusion der Proteine in Richtung Oberfläche erfolgt in zwei Phasen. Zu Beginn besteht ein sehr schneller diffusionskontrollierter Prozess, bei dem das Protein sofort adsorbiert, sobald es an der freien Oberfläche ankommt. Die zweite Phase erfolgt langsam, da es schwierig für das Protein wird, einen freien Platz zu finden [Andrade 1986, Horbett 1992]. Bei mehreren sich in Lösung befindlichen Proteinen, wie im Blutplasma, kommt es an der Oberfläche zusätzlich noch zu einer Konkurrenzsituation zwischen den verschiedenen Proteinmolekülen. Bei Untersuchungen eines Multiprotein-Adsorptionsmodells an Oberflächen wurde dieser Effekt nachgeahmt. Adsorptionsversuche an Polystyrol mit Plasma, das Albumin, Fibrinogen und Immunglobulin G (IgG) enthielt, haben gezeigt, dass die anfängliche Adsorption durch die kleinen Proteine (z. B. Albumin) dominiert wird, die in hoher Konzentration vorlagen. Kleine Moleküle diffundieren schneller als große. Im Laufe der Zeit werden diese aber durch größere Proteine wie IgG und Fibrinogen auf der Oberfläche ersetzt. Diese sequentielle Adsorption wird auch als Vroman-Effekt bezeichnet [Vroman et al. 1977, Lu et al. 1994]. Neue

Studien von Fang und Szleifer (2001) haben allerdings nachweisen können, dass diese Reihenfolge bei Einsatz anderer Oberflächenmaterialien nicht mehr unbedingt gegeben ist. Die Zusammensetzung der Lösung und die Interaktion von Protein und Oberfläche müssen unbedingt bekannt sein und untersucht werden.

Bei der Bindung von Proteinen spielt die Dichte der Bindungsstellen auf der festen Oberfläche eine wichtige Rolle. Eine sehr hohe Dichte liegt bei hydrophoben Oberflächen wie z.B. Polyethylen (PE), Polypropylen (PP) oder Polystyrol (PS) vor. Jede Monomereinheit des Polymers, die sich an der Oberfläche befindet geht mit hydrophoben Domänen des Proteins Wechselwirkungen ein [Andrade 1986]. Der Einfluss der Bindungsstellendichte wurde auch bei der konventionellen Proteinadsorptionschromatographie beobachtet, sei es durch hydrophobe oder auch ionische (elektrostatische) Wechselwirkungen zwischen Matrix und Protein. Ist die Dichte an Bindungsstellen an der Säulenmatrix hoch, wird das Protein irreversibel gebunden, wie in Abbildung 2-4 schematisch dargestellt wird.

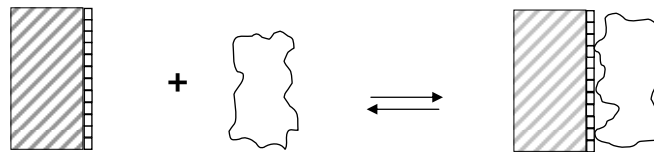


Abbildung 2-4: Typische Adsorbentoberfläche mit einer hohen Bindungsstellendichte. Adsorbierte Proteine gehen multivalente Wechselwirkungen mit OF ein, die bei ausreichender Bindungsanzahl auch irreversibel sein können.

## Proteineigenschaften

Aber nicht nur die Bindungsstellen des Feststoffes sind wichtig. Auch die verfügbaren Regionen auf der Proteinoberfläche sind entscheidend. Albumin z.B. ist ein stark hydrophobes Protein, das auf hydrophoben Oberflächen irreversibel bindet. An stark hydrophilen Quarzoberflächen jedoch findet eine reversible Bindung statt. Die hydrophoben Wechselwirkungen sind im letzten Beispiel eher minimal, während die adsorptive reversible Hauptwirkung auf ionischen Interaktionen basiert [Andrade 1986, Gray 2004]. Bei der Proteinadsorption wurden nicht-kovalente bzw. elektrostatische Bindungen (Wasserstoffbrückenbindungen) und hydrophobe Wechselwirkungen beobachtet, jedoch keine kovalenten [Horbett 1992, Brash und Horbett 1995]. Um wertvolle Informationen über die Bindung von Proteinen an Oberflächen zu gewinnen, müssen Oberflächen und Proteine gewählt werden, deren Oberflächenstruktur im Vorfeld bereits sehr gut charakterisiert worden sind.

Die Proteinadsorption ist von verschiedenen Faktoren wie den Protein- und Oberflächeneigenschaften und Umgebungsbedingungen abhängig. Bei letzterem Punkt sind der pH-Wert, die Ionenstärke, Puffertyp und Hilfsstoffzusätze von großer Bedeutung. In Bezug auf das Protein sind hier die Molekülgröße, Ladung, Strukturstabilität, Primärstruktur und Konformation für die Adsorption wichtig. Vor allem die Stabilität der Proteinstruktur ist von entscheidender Bedeutung. Proteine, die eine hohe innere Stabilität besitzen („hard“ proteins), wie z.B. Lysozym, adsorbieren an hydrophilen Oberflächen in einem sehr geringen Maße, es sei denn es herrscht elektrostatische Anziehung an der Oberfläche durch Wahl eines geeigneten pH-Wertes. Eine höhere Adsorption allerdings erfolgt an hydrophoben Oberflächen. Proteine mit einer niedrigen inneren Stabilität („soft“ proteins), wie z.B. BSA, neigen dazu, auf allen Oberflächen zu adsorbieren, unabhängig auch von elektrostatischen Wechselwirkungen. Sie scheinen eine höhere Oberflächenaffinität zu besitzen als stabile Proteine [Brash und Horbett 1995, Nadarajah et al. 1995]. Dieser Prozess wird auf einen konformativen Entropiegewinn bei Adsorption dieser Proteine an die Oberfläche zurückgeführt, die zu einer höheren Stabilität des Moleküls führt. Nach Adsorption an einer hydrophoben Fläche unterliegen diese Proteine einer umfangreichen Konformationsänderung [Nakanishi et al. 2001].

Das Interesse am Adsorptionsverhalten von Proteinen an festen Oberflächen ist in den letzten Jahren gestiegen. Das Verhaltensmuster von Proteinen an der Luft-Feststoff-Grenzfläche konnte allerdings schon früher zeigen, dass adsorbierte Proteine detektierbaren Konformationsänderungen unterliegen.

Haynes et al. (1995) konnten zeigen, dass bei der Adsorption des strukturstabilen Lysozyms an negativ geladenem Polystyrol nur ein kleiner Teil seiner Sekundärstruktur verloren geht, während das instabilere Protein  $\alpha$ -Lactalbumin fast vollständig denaturiert. Eine mögliche Theorie dafür wurde von Horbett (1992) entwickelt. Native Proteine, die in wässriger Lösung einen hydrophoben Kern besitzen, scheinen eine hohe Tendenz zu haben, ihre im Kern „versteckten“ Aminosäurereste nach außen zu bringen, um Kontakt mit hydrophoben Oberflächen zu bekommen. Diese resultierende hohe Antriebskraft bewirkt eine strukturelle Umorientierung innerhalb des Proteins an der Oberfläche und führt so zu einer Denaturierung des nativen Moleküls. Das entfaltete Molekül ist außerdem in der Lage mehr Bindungen pro Molekül mit der Oberfläche einzugehen (multiple-bonding), als in seiner nativen Form. Nadarajah et al. (1995) vertieften diese mögliche Erklärung. Bei der „Freilegung“ der hydrophoben Reste gegenüber der wässrigen Lösung resultieren Entropieverluste durch umgebende Wassermoleküle. Die hydrophobe Antriebskraft bewirkt eine Adsorption des Proteins an der Oberfläche mit dem Ziel, diese Gruppen vor dem Wasser zu verbergen.

Ob mit der Denaturierung auch ein Aktivitätsverlust der Proteine einhergeht, wurde anhand von Adsorptionsuntersuchungen mit Enzymen an festen Oberflächen untersucht. Grundsätz-

lich wird die biologische Aktivität der Proteine durch eine korrekte dreidimensionale Konfiguration der Polypeptidkette in der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur bestimmt. Strukturinstabile Enzyme zeigten nach Adsorption an bestimmten Oberflächen einen Aktivitätsverlust, wenn sich nach Anlagerung auch ihr  $\alpha$ -Helixanteil verändert [Nakanishi et al. 2001]. Welche Aminosäuren an diesen Interaktionen beteiligt und für das Adsorptionsverhalten verantwortlich sind, wurde mit verschiedenen Peptidsequenzen untersucht. Peptide, die reich an Serin und Threonin sind und zusätzlich auch Asparagin- und Glutaminreste besitzen, zeigen eine hohe Adsorptionsaffinität. Mit Hilfe des Adsorptionsverhaltens von Peptidelementen und Informationen über die dreidimensionale Struktur des jeweiligen Proteins, kann eine gute Voraussage über die Stellen innerhalb des Moleküls getroffen werden, die für die Wechselwirkungen verantwortlich sind. Ein vollkommener Aktivitätsverlust muss aber nicht nur auf die Adsorption zurückzuführen sein. Es ist noch sehr wenig über kovalente Änderungen in adsorbierten Proteinen bekannt, aber jede Denaturierung, die ihre Adsorption begleitet, lässt das Protein wahrscheinlich noch anfälliger für andere Enzyme, wie z.B. Proteasen, werden, die aus zerstörten Zellen stammen können. Diese proteolytisch aktiven Zellen könnten zusätzlich zu einer Spaltung des adsorbierten Moleküls führen und dessen Abbau beschleunigen [Brash 1987].

### **Proteinkonzentration**

Bei der Betrachtung struktureller Änderungen des Proteins während der Adsorption sind die Oberflächengröße und die Konzentration des Proteins wichtig. Morrissey (1977) nahm an, dass das adsorbierte Protein bei geringen Konzentrationen genügend Zeit hat, sich durch konformative Änderungen an seine neue Umgebung anzupassen, indem es neue Bindungen mit einer Quarzoberfläche eingehen kann. Das Protein erlebt also während des Adsorptionsprozesses eine Entfaltung mit einer maximalen Anzahl an Bindungsstellen [Brash und Horbett 1995, Horbett 1992]. Bei hohen Konzentrationen ist die Frequenz, mit der Oberfläche zu kollidieren, so hoch, dass ein adsorbiertes Protein weder die Zeit, noch den Raum hätte, seine Wechselwirkungen mit der Oberfläche weiter auszubauen. Je höher die Konzentration, desto geringer ist die Adsorption. Abbildung 2-5 zeigt eine schematische Darstellung dieser Theorie. Ist das Protein mit einem kleinen Teil an der Oberfläche angeheftet, wird der Rest des Moleküls in die Grenzfläche „nachgezogen“, um so die Interaktionen zu optimieren. Bereits adsorbierte Moleküle können anschließend über die Oberfläche diffundieren, aber nicht sehr leicht wieder desorbieren [Brash und Horbett 1995]. Adsorbierte Proteine sind nicht in der Lage, sich zu drehen, da sie über mehrere Bindungen an der Oberfläche gebunden sind [Horbett 1992]. Nur der Proteinteil, der adsorbiert, ist auch denaturiert.

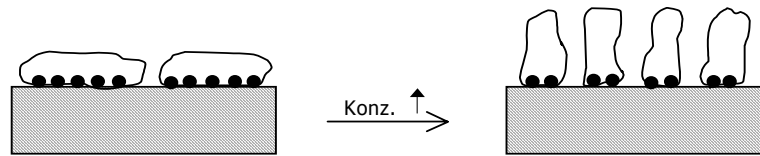


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung von Morrissey's Überlegungen. Bei geringen Konzentrationen kann sich das Protein optimal mit der maximal möglichen Anzahl an Bindungsstellen an die Oberfläche anhaften, da es nur wenige „Nachbarn“ gibt. Bei hohen Konzentrationen wird jedes adsorbierte Protein sofort von anderen umringt und so die Wahrscheinlichkeit verringert, dass es sich konformativ an der Grenzfläche anpassen kann [aus Andrade 1986].

Wenn das Verhältnis von Feststoffoberfläche zur Lösung sehr hoch ist, ist die Proteinmenge, die adsorbieren und denaturieren könnte, verhältnismäßig klein. Eine Denaturierung großer Proteinmengen ist eher in der Luft/Wasser-Grenzfläche zu beobachten, da durch Schütteln immer wieder neue Grenzflächen geschaffen werden können, an denen Proteine adsorbieren können [Horbett 1992].

Die Adsorption von Proteinen an festen Oberflächen führt zu einer Proteinkonzentration in der Oberfläche, die viel höher ist als die Konzentration im Bulk, aus dem das Protein diffundiert ist. Bei einer Proteinlösung mit einer Konzentration von z. B. 1 mg/ml beträgt die adsorbierte Menge ca. 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Wird ein Proteindurchmesser von 10 nm angenommen, herrscht eine lokale Proteinkonzentration in der Grenzfläche von 1000 mg/ml. Somit befindet sich an der Phasengrenzfläche eine 1000fach höhere Proteinkonzentration als in der Bulkphase [Horbett 1992].

### **Oberflächenaktive Substanzen**

Bei der Herstellung und Lagerung der Proteinarzneistoffe sind diese vielen verschiedenen Oberflächen ausgesetzt. Um Oberflächeninteraktionen zu minimieren, können den Proteinarzneistofflösungen Hilfsstoffe wie Polymere oder Salze zugesetzt werden. In Gegenwart von oberflächenaktiven Substanzen kann die Proteinadsorption reduziert werden, da Tensid-Oberflächen-Wechselwirkungen die Protein-Oberflächen-Interaktionen überwiegen. Zwei Möglichkeiten, die Proteinadsorption zu verringern, sind entweder der Oberflächeneffekt, bei dem das Tensid in der Lage ist, mit der Oberfläche zu interagieren und so die Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen zu reduzieren, oder durch den Lösungseffekt, bei dem das Tensid die Lösungseigenschaften des Proteins verbessert. Der hydrophobe Anteil des Tensids scheint dabei ein wichtiger Faktor für die Fähigkeit zur Verminderung der Adsorption zu sein.

[Duncan et al. 1995]. Tenside sind in der Lage, als adsorptionskontrollierende Hilfsstoffe zu fungieren [Witthohn et al. 1996].

## **Oberflächen**

Um Proteinadsorption erfolgreich untersuchen zu können, ist die Charakterisierung der Modelloberflächen ein entscheidender Faktor. Die vorherrschenden Adsorptionsmechanismen ändern sich mit verschiedenen Oberflächen (Glas oder Kunststoff) und den Umgebungsbedingungen [Duncan et al. 1995]. Eine geeignete Modifikation der Oberflächenstruktur, z.B. durch unterschiedliche Substitutionsgrade von Liganden, kann dazu genutzt werden, Protein-Oberflächen-Interaktionen zu „lenken“ [Kawaguchi 2000]. Es existieren zahlreiche Methoden für die Untersuchung von Proteinen in Grenzflächen. Dabei ist die Technik heute schon in der Lage, adsorbierte Moleküle direkt auf der Oberfläche zu untersuchen wie es mit der Atomic Force Microscopy (AFM), Transmissionsinfrarotspektroskopie oder Ellipsometrie möglich ist [Andrade 1986, Cullen und Lowe 1994, Hlady und Buijs 1996, Nakanishi et al. 2001]. Mit Hilfe spektroskopischer Methoden wie des Circular dichroismus, der Raman-Spektroskopie oder der Fluorimetrie können Konformationsänderungen von Proteinen in Lösung untersucht werden. Die Messungen konnten zeigen, dass das Ausmaß der Konformationsänderung von der Lagerungszeit abhängig ist. Eine Kontaktzeit von mehr als 10 Tagen war nötig, um strukturelle Änderungen zu beobachten [Soderquist und Walton 1980, Andrade 1986]

Eine weitere Methode ist die Titration, die Rückschlüsse auf titrierbare Gruppen innerhalb des Moleküls zulässt: Adsorption führt zu einem Anstieg oder Abfall bestimmter saurer oder basischer Gruppen. Titrationsdaten können im Hinblick auf Konformationsänderungen eines Proteins interpretiert werden [Soderquist und Walton 1980]. Auch thermodynamische Untersuchungen an Proteinen werden heutzutage eingesetzt, um eine umfassende Aufklärung der Triebkraft biochemischer Reaktionen zu leisten.

Streitpunkt vieler Arbeitsgruppen ist die Frage, ob die Adsorption ein reversibler Prozess ist, also ob eine Desorption bereits adsorbierter Proteinmoleküle eintritt. Adsorption scheint ein von Natur aus reversibler, aber langsamer Prozess zu sein [Brash 1991]. Zwei Gründe unterstreichen diese These: Bei Betrachtung der klassischen Adsorptionsisothermen nach Langmuir, bei der die adsorbierte Proteinmenge bei einer bestimmten Temperatur gegen unterschiedliche Bulkkonzentrationen aufgetragen wird, ist die anfängliche Steigung nur begrenzt und endet dann in einem (Sättigungs)-Plateau. Außerdem konnte in den meisten Systemen ein Austausch von Molekülen stattfinden, was durch den bereits beschriebenen Effekt von Vroman bestätigt werden konnte. Dieses Verhalten der Proteine zeigt die Reversibilität der adsorbierten Proteine mit längerer Lagerungszeit. Soll eine schnellere Desorption erfol-

gen, müssen zum Teil drastische Maßnahmen eingesetzt werden, um die Proteine aus der Grenzfläche zu verdrängen. Dieses wird am besten mit Hilfe von Tensiden erreicht, die durch ihre Grenzflächenaktivität in der Lage sind, Proteine zu desorbieren und auszutauschen [Arnebrant und Wahlgren 1995]. Auch dieser Prozess geschieht langsam und zum Teil unvollständig, es sein denn, die Bindung des adsorbierten Moleküls ist sehr schwach (z.B. an hydrophilen Oberflächen), oder es werden hohe Konzentrationen des Tensids eingesetzt. Experimente zeigten, dass eine Desorption eher durch Tenside oder andere proteinhaltige Systeme wie Blut oder Plasma, erfolgt, als durch das Lösungsmittel selbst, in dem sich das Protein befindet [Horbett 1992].

Um den negativen Effekt einer Proteinadsorption an Primärpackmitteln zu minimieren bzw. zu verhindern, werden schon seit längerer Zeit Protein-resistente Oberflächen entwickelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei der Beschichtung von Oberflächen z.B. mit Polyethylenoxid (PEO) eine verminderte Proteinadsorption festgestellt wurde. Der Mechanismus ist nicht genau bekannt. Vermutlich spielt die große Hydrophilie, Flexibilität und der große Rauminhalt der Ketten auf der Oberfläche eine Rolle, die zu einer sterischen Abstoßung der Proteine führen und so van der Waals-Anziehungskräfte unterbinden [Brash und Horbett 1995].

Die Hauptmechanismen der Proteinadsorption sind bis zum heutigen Tag noch nicht bis ins Detail geklärt worden. Mit neuen Techniken sind die Forscher aber mittlerweile in der Lage, den Adsorptionsprozess besser zu beleuchten. Eine genaue Vorhersage über das Verhalten eines Proteins in der Flüssig/Feststoff-Grenzfläche lässt sich aber noch nicht treffen. Entscheidend für das Verhalten sind neben den Proteineigenschaften, die Feststoffoberfläche, die Umgebungsbedingungen und evtl. vorhandene Hilfsstoffzusätze in der Lösung.

### 2.1.5 Lysozym

Lysozym, auch bekannt unter dem Synonym Muramidase, wurde 1922 von Alexander Fleming im Hühnereiweiß entdeckt. Es ist ein Enzym, das in Speichel, Tränen, Nasen- und Darmschleimhäuten und auch im Blutplasma vorkommt. Lysozym gehört zu der Gruppe der Mucopolysaccharide und ist als 1,4- $\beta$ -Acetylmuramidase C in der Lage, Bakterien aufzulösen, indem es den Polysaccharidteil ihrer Zellwände aufspaltet. Bakterien besitzen in ihrer Zellwand eine Festigkeit verleihende Schicht aus Murein, ein Peptidoglykan, das aus zwei Polysaccharidketten aufgebaut ist. Es handelt sich bei diesen Zuckern um *N*-Acetylmuraminsäure (MNAc) und *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc), Derivate des Glucosamins, die alternierend  $\beta$ -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Durch eine zusätzliche Quervernetzung dieser gera-



den unverzweigten Ketten über Peptidbrücken, erhält das Murein der Bakterienzellwand seinen netzartigen Aufbau.

Lysozym ist nur in der Lage, die glykosidische  $\beta$ -1,4-Bindung zwischen dem C-1-Atom des MNAc und dem C-4-Atom von GlcNAc zu hydrolysieren (siehe Abbildung 2-6).

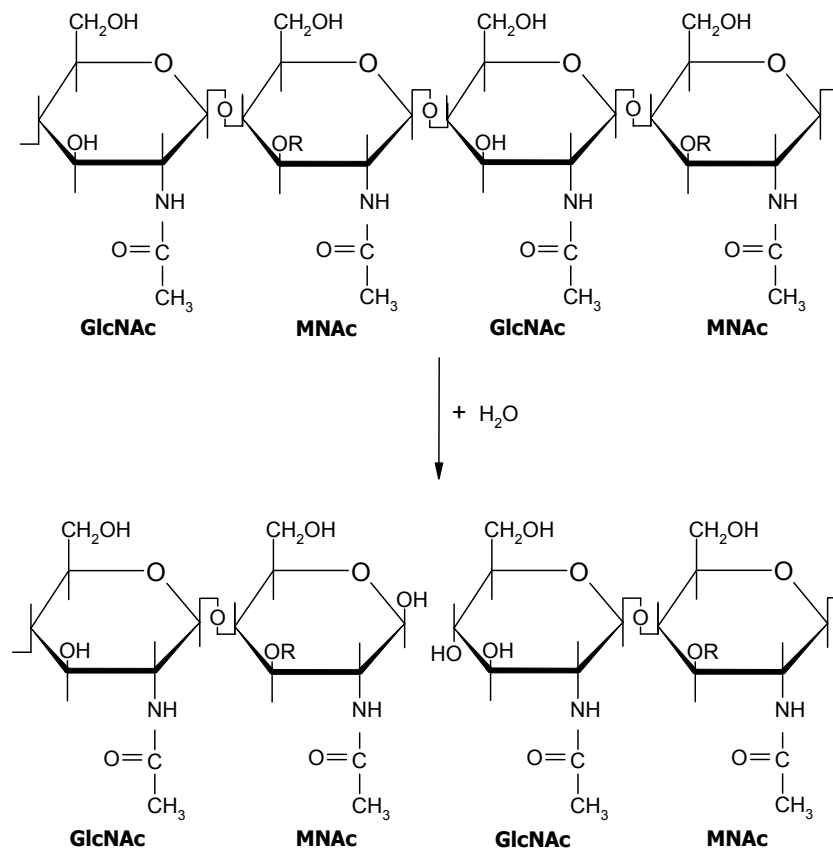


Abbildung 2-6: Hydrolyse der glykosidischen  $\beta$ -1,4-Bindung zwischen MNAc und GlcNAc durch Lysozym.

Ist die Zellwand zerstört, erfolgt ein osmotisches Eindringen von Wasser, die Zelle schwillt an und platzt [Lehninger et al. 2001]. Lysozym hat somit eine wichtige physiologische Bedeutung für den menschlichen Organismus bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen [Stryer 1990].

Therapeutisch verwendetes Lysozym wird aus Hühnereiern gewonnen und heißt daher auch Hen Egg-White-Lysozyme (HEWL). Es handelt sich um ein monomeres Polypeptid, das aus 129 Aminosäuren besteht, ein Molekulargewicht von 14310 Dalton hat und einen Isoelektrischen Punkt (IEP) von 11,2 aufweist [Brenda 2006]. Lysozym besitzt ein pH-Optimum von 5,5 und zeigt seine höchste Aktivität bei 40 °C [Zubay 2000, Brenda 2006].

Die Aminosäuresequenz und somit die Primärstruktur des Lysozyms wurde bereits 1963 von Canfield (1963) beschrieben. Das Enzym wird durch zwei strukturelle Bereiche charakteri-

siert: eine  $\alpha$ -Domäne, die aus 4  $\alpha$ -Helices besteht und eine  $\beta$ -Domäne mit drei  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen [Schwalbe et al. 2001]. Der helikale Anteil in der Sekundärstruktur des Lysozyms beträgt ca. 29 %, 5 % sind  $\beta$ -Faltblatt. Den Rest bilden Proteinschlaufen aus, die durch Wasserstoffbrücken strukturiert werden. Durch 4 Disulfidbrücken und zahlreiche Wasserstoffbrücken entwickelt Lysozym eine globuläre Form mit komplexer Faltung, die wie bei allen Proteinen durch hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommt. In Abbildung 2-7 ist die Sekundärstruktur des Enzyms dargestellt.

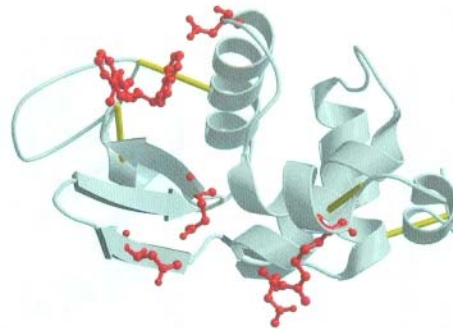


Abbildung 2-7: Dreidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur von Lysozym [aus Lehninger et al. 2001].

Lysozym ist das erste Molekül, dessen dreidimensionale Struktur durch Röntgenbeugungsanalyse aufgeklärt wurde [Blake et al. 1965] und seitdem auch als Modellprotein zur Untersuchung grundlegender Gesetzmäßigkeiten wie der Proteinstruktur, -funktion und -faltung dient [Jollés und Jollés 1984]. Die Untersuchung des Spaltungsmusters verschiedener Substrate durch Lysozym [Rupley et al. 1967] und Röntgenbeugungsmessungen mit Inhibitoren [Cheetham et al. 1992] lieferten Informationen über das aktive Zentrum und die Art und Weise der Substratbindung (Katalysemechanismus).

Für einen optimalen Umsatz sollte das Substrat (GlcNAc) mindestens aus 6 Zuckerresten (A-F) bestehen, die über Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum des Enzyms festgehalten werden [Rupley et al. 1967, Imoto 1996]. Man fand nach Spaltung unterschiedlich langer Substratmoleküle von Lysozym heraus, dass die  $\beta$ -glykosidische Bindung zwischen dem vierten und fünften (Ring D und E) GlcNAc-Molekül hydrolysiert wird. Entscheidend für die Katalyse sind die nichtionisierte Carboxylgruppe der Glutaminsäure 35 (Glu 35) und das ionisierte Carboxylat der Asparaginsäure 52 (Asp 52) des Lysozyms, die sich in der Nähe des katalytischen Zentrums befinden. Glu 35 befindet sich in einer unpolaren, Asp 52 in einer polaren Region des Moleküls [Phillips 1967]. Sie bilden bei der Katalyse eine Art Klammer um die zu spaltende Substratbindung. Durch Übertragung eines Protons von Glu 35 auf den Bräu-

ckensauerstoff der glykosidischen Bindung zwischen Ring D und E wird diese gespalten. Es entsteht dabei am C1-Atom des Ringes D eine positive Ladung, ein Carbenium-Ion, das sowohl durch die negative Ladung des Asp 52, als auch durch eine Konformationsänderung des Zuckerringes stabilisiert wird. Die Ringe E und F dissoziieren ab. Durch Aufnahme eines Wassermoleküls erfolgt die Anlagerung eines  $\text{OH}^-$ -Ions an das Carbenium-Ion und die Protonierung der Glu 35. Anschließend dissoziieren die Ringe A-D ab, das aktive Zentrum ist wieder frei, und Lysozym steht für einen neuen Katalysevorgang zur Verfügung [Karlson et al. 1994]. Diese Katalysereaktion ist bei dem pH-Optimum 5,5 des Enzyms aus dem Grunde möglich, da Glu 35 protoniert und Asp 52 dissoziiert vorliegen. Abbildung 2-8 veranschaulicht diese Reaktion (Klammer mit Asp 52 ist nicht abgebildet).

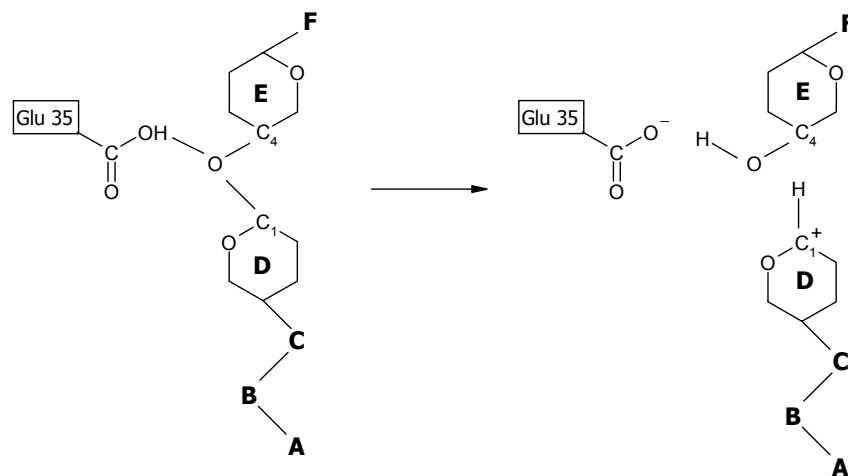


Abbildung 2-8: Hydrolyse eines Substrates  $(\text{GlcNAc})_6$  durch Lysozym [Karlson et al. 1994].

### 2.1.6 Mistellektin

Rudolph Steiner, der Begründer der anthroposophischen Medizin, entdeckte bereits in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts die Mistel als Therapeutikum in der Krebsbehandlung. Der Pflanze wurde eine immunstimulierende Wirkung zugesprochen, die das Allgemeinbefinden der Patienten steigern sollte. In der Schulmedizin werden Mistelextrakte, gewonnen aus der Pflanze *Viscum album*, seit einigen Jahren in der adjuvanten Krebstherapie und zur Immunstimulation eingesetzt [Franz 1985, Hajto et al. 1989, Rostock 2000, Mengs et al. 2002]. Bekannt ist, dass sich das Mistellektin (ML) an bestimmte Glykoproteine auf der Oberfläche von Zellen (Lymphozyten und Monozyten) heftet. Auf diese Bindung reagieren die Abwehrzellen des Organismus und setzen wie bei einer Infektion Zytokine, wie Interferon, Interleukin oder den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), frei, die ihrerseits das gesamte Abwehrsystem alarmieren. Es kommt zu einer Stimulierung natürlicher Killerzellen, was die immunstimulierende Wirkung des Enzyms unterstreicht [Hajto et al. 1989, Hajto et al. 1990, Eschenburg et

al. 1998]. Ein direkter Zusammenhang zwischen der anregenden Immunsystemwirkung der Mistellektine und einer Tumor-wirksamkeit in der Klinik, d.h. einem direkten Absterben der kranken Zellen, konnte bis heute nicht nachgewiesen werden. Anwendung findet die Misteltherapie als subcutane Injektion mit einer optimalen Dosis des Mistellektin I von 1 ng/kg Körpergewicht [Hajito et al. 1989; Eck et al. 1999 b].

Ursprünglich wurde die pharmakologische Wirkung den stärker toxischen Viscotoxinen zugeschrieben. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass die Wirkung hauptsächlich auf die im Extrakt enthaltenen Lektine zurückzuführen ist [Holtskog et al. 1988]. ML ist der in der Literatur gebräuchliche Name, der auf die Lektineinheit im Molekül hinweist. Das Protein ist aber auch ein Toxin mit einer katalytischen Einheit (Enzym) und einer kohlenhydratbindenden Einheit (Lektin) [Langer et al. 1999]. Die Namen Viscumin oder Viscum album Agglutinin werden in der Literatur synonym für ML verwendet.

Im Gesamtextrakt sind drei Isoformen der Lektine enthalten. Mistellektin I, II und III bilden die pharmazeutisch wirksamen Inhaltsstoffe der Mistelextrakte, sie weichen aber hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität deutlich voneinander ab [Franz et al. 1981]. Untersuchungen konnten allerdings zeigen, dass das Mistellektin I die für die Wirksamkeit des Mistels entscheidende Komponente darstellt [Beuth et al. 1993]. Dieses ML wurde von Hajito et al. 1989 zum ersten Mal isoliert. Da sich pflanzliche Arzneimittel je nach Herkunft, Erntezeitpunkt und Wetterbedingungen in ihrer Zusammensetzung unterscheiden können, ist eine Standardisierung der Extrakte sinnvoll [Wagner et al. 1986]. Aus diesem Grund wurde Mistellektin I in seiner molekularen Struktur von Krauspenhaar et al. 1998 vollständig aufgeklärt. Durch die Aufklärung der Gensequenz des Mistellektins aus *Viscum album* ist die gentechnische Herstellung als rekombinantes Protein (rML) realisierbar geworden [Eck et al. 1999 a]. Somit ist es möglich ein Arzneimittel herzustellen, dass eine gleich bleibende Qualität aufweist, die der klassisch synthetischer Präparate gleichkommt [Schöffski et al. 2004]. Das rekombinante ML unterscheidet sich in dieser Hinsicht nicht von seinem natürlichen Modell und besitzt somit die gleichen Eigenschaften [Eck et al. 1999 b; Müthing et al. 2005, Müthing et al. 2002].

Der einzige Unterschied zwischen beiden besteht darin, dass das bakteriell exprimierte Protein im Unterschied zu dem natürlich vorkommenden ML nicht glykosyliert ist.

#### *2.1.6.1 Struktur des rekombinanten Mistellektins I*

Das rekombinante Mistellektin I (rML I) ist ein Heterodimer mit einer molekularen Masse von 56 kDa, das aus zwei funktionellen Untereinheiten aufgebaut ist. Diese Einheiten, die als A- und B-Kette bezeichnet werden, sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (siehe

Abbildung 2-9). Dieses Protein besitzt eine differenzierte molekulare Wirkung, welche aus den unterschiedlichen biologischen Funktionen beider Untereinheiten resultiert.

Die A-Kette (26 kDa) besitzt 28 S-rRNA-*N*-Glykosidase-Aktivität [Eck et al. 1999 a]. Aufgrund ihrer rRNA-spaltenden enzymatischen Aktivität wird das Mistellektin zu der Gruppe der Ribosomen-inaktivierenden Proteine vom Typ II gezählt (RIP II) [Mengs et al. 2002]. RIP sind eine Gruppe von Proteinen, die die Proteinbiosynthese von Ribosomen hemmen. Es gibt grundsätzlich 2 Arten von RIP. Typ I RIP besitzen eine einzige Polypeptidkette. RIP vom Typ II besitzen zwei Ketten: Eine A- und eine B-Kette [Franz 1986].

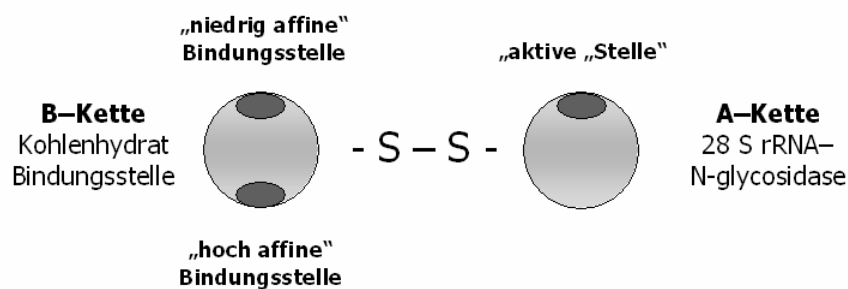


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung des Mistellektins. Die A- und B-Kette sind über eine Disulfidbrücke verbunden. Die A-Kette zeigt *N*-Glykosidase-Aktivität und inaktiviert die 28 S ribosomale Untereinheit. Die B-Kette stellt die Kohlenhydratbindungsdomäne dar.

Die A-Kette inaktiviert die ribosomale 28 S-Untereinheit, indem sie spezifisch ein Adenin der eukaryontischen rRNA abspaltet, was dazu führt, dass die Proteinbiosynthese gehemmt wird und somit ein programmierter Zelltod (Apoptose) eintritt [Endo et al. 1988, Mengs et al. 2002]. Diese zytotoxische Wirkung wird allein der A-Kette zugeschrieben. Die B-Kette (30 kDa) ist für den therapeutischen Effekt des Moleküls verantwortlich. Sie besitzt Kohlenhydratbindungsstellen (siehe Abbildung 2-9), die selektiv an  $\beta$ -2,6-verknüpfte Neuraminsäuren und auch in abgeschwächter Form an endständige  $\beta$ -D-Galaktose der Zielzellen binden [Lee et al. 1992, 1994, Müthing et al. 2002, Müthing et al. 2005]. Diese Bindungsspezifität ermöglicht rML I, an Oberflächen unterschiedlicher Zelltypen zu binden, was zu einer Agglutination dieser Zellen führt. Es konnte beobachtet werden, dass die über die B-Kette vermittelte Zellbindung eine deutlich höhere Zytotoxizität des Moleküls aufweist, als die isolierte A-Kette [Stirpe et al. 1992].

Beim Mistellektin I handelt es sich um ein globuläres Protein, dessen Tertiärstruktur in Abbildung 2-10 dargestellt ist.

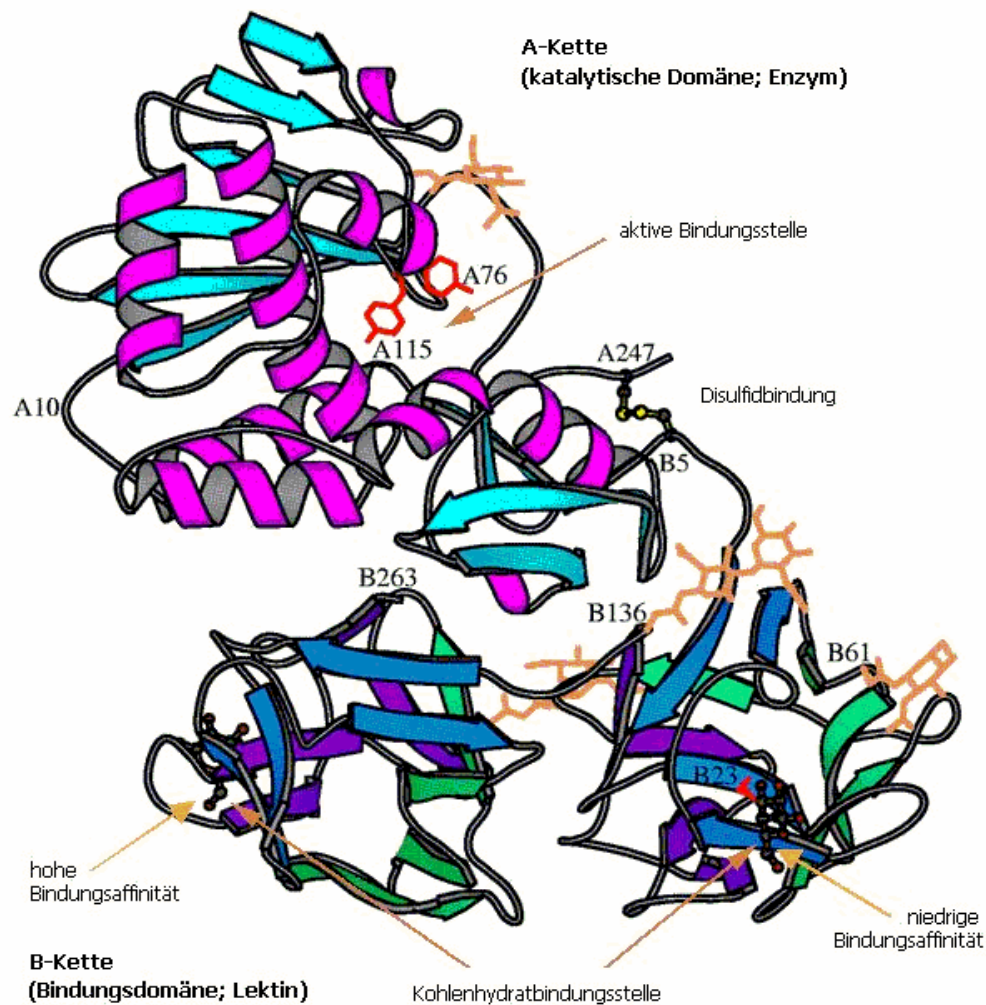


Abbildung 2-10: Dreidimensionale Darstellung von Mistellektin [modifiziert nach Niwa et al. 2003]

Die A-Kette ist ein aus 252 Aminosäureresten bestehendes Enzym, das aus drei Domänen aufgebaut ist, von denen zwei die  $\alpha$ -Helix- und eine die  $\beta$ -Faltblattstrukturen einnehmen. Das aktive Zentrum bildet aufgrund der spezifischen Anordnung bestimmter Reste eine markante Spalte in der A-Kette des Moleküls aus [Krauspenhaar et al. 1999], wie in Abbildung 2-10 gezeigt wird. Die B-Kette ist ein Lektin bzw. ein Glykoprotein bestehend aus 263 Aminosäureresten, das zwei Domänen besitzt, die ausschließlich  $\beta$ -Faltblattsekundärstrukturen aufweisen. Diese B-Untereinheit besitzt mehrere Kohlenhydratbindungsstellen, die in der Lage sind, mit Zuckerstrukturen der Zielzellen zu interagieren. Beide Ketten sind über eine Disulfidbrücke zwischen Cys 247 der A-Kette und Cys 5 der B-Kette miteinander verbunden. Neben dieser Disulfidbrücke gibt es zusätzliche nicht-kovalente Wechselwirkungen, die die beiden Untereinheiten und somit die globuläre Struktur des Proteins stabilisieren [Krauspenhaar et al. 1999]. Die Individualität beider Ketten, die für die zytotoxische Wirkung essentiell ist, bleibt aber bestehen [Eck et al. 1999 b].

#### 2.1.6.2 Herstellung von rekombinantem Mistellektin

Mistellektin kann rekombinant in *E.coli* hergestellt werden [Eck et al. 1999 a, 1999 b], wobei die A- und B-Kette getrennt synthetisiert werden. Von der Genexpression bis zur Abfüllung des fertigen rekombinanten Mistellektins (rML) müssen 19 verschiedene Stufen durchlaufen werden. Während der Fermentation von *E.coli* werden die beiden Untereinheiten jeweils in sogenannten *inclusion bodies* eingeschlossen. Diese Einschlusskörperchen sind unlöslich und müssen anschließend isoliert, aufgereinigt und mit Hilfe eines Denaturierungspuffers aufgeschlossen werden. Nach Zugabe eines Renaturierungspuffers befindet sich die rekombinant hergestellte Einzelkette dann im Überstand. Anschließend werden die beiden Einzelketten A und B mit Hilfe der Glutathion-Proteindisulfidisomerase (Redox-System) miteinander verknüpft und das Dimer erhält durch korrekte Faltung und Ausbildung der Disulfidbrücken seine native Konformation. Nach zwei Reinigungsschritten mittels Affinitätschromatographie zur Abtrennung von Verunreinigungen beträgt die Ausbeute ca. 10 % [Gloger 2002].

#### 2.1.6.3 Wirkungsmechanismus

Die A-Kette wird nach spezifischer Bindung der B-Kette an die Zielzelle über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Nach Spaltung des Heterodimers im endosomalen Vesikel, wird die A-Untereinheit in das Zytoplasma und anschließend auf noch ungeklärte Weise in das Zytosol überführt, die B-Untereinheit im Endosom abgebaut. Die A-Kette spaltet ein Adenin aus der 28 S-rRNA ab und bricht somit die ribosomale Proteinbiosynthese ab [Endo et al. 1988, Mengs et al. 2002]. Die Folge ist ein programmierter Zelltod, durch den die Freisetzung von Zytokinen hervorgerufen wird [Menges et al. 2002]. In vitro-Untersuchungen an MOLT-4-Zellen und die Zugabe von Inhibitoren wie Galaktose zeigen, dass die Zytotoxizität des Mistellektins deutlich vermindert werden kann und somit eine Aufnahme des Moleküls in die Zelle durch Endozytose für die Wirkung unbedingt nötig ist [Frantz et al. 2000]. Durch den hemmenden Zucker wird die Kohlenhydratbindungsstelle des Enzyms blockiert und eine Bindung an die Zielzelle unterbunden. Mistellektin muss also in seiner intakten dimeren Form über die B-Kette an die Zelle binden, damit die A-Kette im Zellinneren, nach Spaltung des Moleküls, zelltoxisch wirken kann. Vergleichende Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Einzelketten mit dem dimeren Protein zeigen, dass sowohl die Lektinaktivität der B-, als auch die *N*-Glykosidaseaktivität der A-Untereinheit wichtig für den zytotoxischen Effekt an Zielzellen ist [Eck et al. 1999 b].

## 2.2 Analytik von Proteinen

### 2.2.1 Circular dichroismus

Der Circular dichroismus (CD) ist eine elektronenspektroskopische Absorptionsmethode im UV/VIS-Bereich, mit deren Hilfe eine Strukturaufklärung chiraler Verbindungen möglich ist [Dominik und Steinhilber 1996]. Chirale Moleküle, z.B. Proteine, besitzen die Eigenschaft, nicht mit ihrem Spiegelbild zur Deckung gebracht werden zu können. Die Hauptursache der Chiralität ist die Anwesenheit eines aktiven (asymmetrischen) Zentrums im Molekül. Dieses stellt in den meisten Fällen ein mit vier unterschiedlichen Resten substituiertes Kohlenstoffatom dar [Buß 1995]. Alle Aminosäuren, bis auf Glycin, besitzen ein der Peptidgruppe benachbartes asymmetrisches  $C_\alpha$ -Atom und sind somit chiral. Dieses führt zu einer Asymmetrie in der Elektronenkonfiguration der Peptidbindung, die noch zusätzlich von den Sekundärstrukturen der Proteine abhängig ist. Aus diesem Grund sind Proteine optisch aktive Verbindungen, deren CD-Spektren ganz wesentlich von der Proteinkonformation bestimmt werden [Woody 1994, Kelly et al. 2005]. Chiralität kann aber auch dann zustande kommen, wenn kein asymmetrisches Zentrum vorhanden ist, sondern die Eigenschaften der Chiralität durch die Umgebung bzw. Struktur des Moleküls vorgegeben werden [Snatzke 1994].

Chirale Verbindungen sind in der Lage, die Ebene von linear polarisiertem Licht zu drehen. Diese Eigenschaft wird als optische Aktivität verstanden. Das linear polarisierte Licht kann auf unterschiedliche Weise entstehen, wie z.B. durch Doppelbrechung, Reflexion oder Streuung, und kann experimentell mittels Polarisatoren (Polarisationsfilter) gewonnen werden [Welfle 1999]. Bei diesem Filter handelt es sich um eine Kunststoffolie aus Cellulosehydrat oder Polyvinylalkohol, in die kleine dichroitische Kristalle eingelagert sind. Erzeugt wird das linear polarisierte Licht, indem isotropes Licht aufgestrahlt wird, das durch die Folie und die integrierten Kristalle doppelt gebrochen wird, aber nur in einer Orientierung fast ungeschwächt durchtreten kann, während die Lichtstrahlen der anderen Orientierung absorbiert werden. Im Gegensatz zum natürlichen Licht schwingt beim linear polarisierten Licht der elektrische Feldvektor nur in einer Ebene, aber trotzdem senkrecht zur Ausbreitungsrichtung [Winter und Noll 1998].

Eine wichtige Form des polarisierten Lichtes für Strukturuntersuchungen an biologischen Substanzen ist das zirkular polarisierte Licht. Zirkular polarisiertes Licht kann mit einem sogenannten  $\lambda/4$ -(Viertelwellenlängen-) Plättchen erzeugt werden, das aus einem doppelbrechenden, optisch anisotropen Material besteht. Anisotrope Medien haben als besonderes Merkmal, dass sie eine Richtungsabhängigkeit physikalischer Eigenschaften aufweisen. Je nach Orientierung des eingestrahlteten linear polarisierten Lichtes besitzt das  $\lambda/4$ -Plättchen



unterschiedliche Brechungsindices und somit unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten. Die Folge ist, dass das linear polarisierte Licht beim Durchstrahlen dieses Plättchens in zwei Strahlen, den ordentlichen und außerordentlichen Strahl, aufgespalten wird. Der außerordentliche Strahl hat aufgrund der unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeit im anisotropen Material einen zeitlichen Vorsprung erlangt, so dass beide austretenden Strahlen einen Gangunterschied aufweisen.

Überlagert man zwei linear polarisierte Lichtwellen, deren elektrische Feldvektoren senkrecht aufeinander stehen und die einen Gangunterschied von  $\lambda/4$ , also  $90^\circ$  zeigen, wird zirkular polarisiertes Licht erzeugt [Winter und Noll 1998].

Bei Summierung beider Feldvektoren erhält man eine Welle, deren Summenvektor  $E$  bei Projektion in eine Ebene einen Kreis beschreibt (siehe Abbildung 2-11).

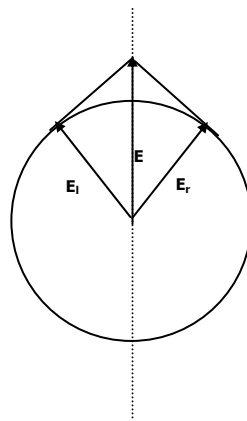


Abbildung 2-11: Zusammensetzung von linear polarisiertem Licht aus zwei gleich großen Komponenten links- und rechtszirkular polarisierten Lichts.

Zirkular polarisiertes Licht kann rechts (RZPL)- oder linkszirkular (LZPL) polarisiert sein, je nach Drehrichtung um den Ausbreitungsvektor. Wird LZPL und RZPL gleicher Amplitude, Frequenz und Winkelgeschwindigkeit kombiniert, wird ein Summenvektor erhalten, der dem elektrischen Feldvektor von linear polarisiertem Licht entspricht [Snatzke 1981]. Linear polarisiertes Licht kann daher als Summe zweier zirkular polarisierter Strahlen verstanden werden.

Circulardichroismus tritt auf, wenn chirale Moleküle rechts und links zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren, d.h. sie besitzen unterschiedliche Absorptionskoeffizienten. Werden RZPL und LZPL mit ungleicher Amplitude kombiniert, was z.B. durch unterschiedliche Absorption beider Strahlen in einem Medium geschieht, erhält man dabei ellip-

tisch polarisiertes Licht. Der elektrische Feldvektor beschreibt dabei eine Ellipse (verzerre Helix) [Schreier et al. 1995].

Bei der Konformationsbestimmung biologischer Substanzen mittels CD kann das resultierende Spektrum dargestellt werden, indem die Differenzen der molaren Absorptionen ( $\Delta A$ ) von RZPL und LZPL gegen die Wellenlänge aufgetragen werden. Häufiger werden in CD-Spektren allerdings die Größen Elliptizität  $\theta$  oder die molare Elliptizität  $[\theta]$  eingesetzt.  $\Delta A$  und  $[\theta]$  sind über den in Gleichung 2-1 angegebenen Zusammenhang miteinander verknüpft [Winter und Noll 1998]:

$$\theta_{\lambda} = K \cdot 1000 \cdot \Delta A \quad [\text{mdeg}] \quad \text{Gleichung 2-1}$$

Die Elliptizität ist wellenlängenabhängig und beschreibt, in welchem Ausmaß die chirale Probe eingestrahlt linear polarisiertes Licht in elliptisch polarisiertes umwandelt. Die Konstante  $K$  in Gleichung 2-2 setzt sich aus folgender Formel zusammen

$$K = \ln 10 \cdot \frac{180}{4\pi} = 32,980 \quad \text{Gleichung 2-2}$$

Die Umrechnung in die molare Elliptizität  $[\theta]$  erfolgt über die Beziehung:

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{\lambda}}{10} \cdot c \cdot L \quad [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}] \quad \text{Gleichung 2-3}$$

wobei die Konzentration  $c$  in  $[\text{mol/l}]$  und der Lichtweg  $L$  in  $[\text{cm}]$  angegeben wird.

Bei Makromolekülen wie Proteinen, die sich aus vielen Elementen mit unterschiedlichen molekularen Massen zusammensetzen, ist es angemessen, die Elliptizität auf die mittlere molare Masse (mean residue weight = MRW) aller enthaltenen Aminosäurereste zu beziehen, wobei die mittlere molare Elliptizität  $[\theta]_{\text{MRW}}$  wie in Gleichung 2-4 berechnet wird:

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \theta_{\lambda} \cdot \frac{\text{MRW}}{10} \cdot c' \cdot L \quad [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}] \quad \text{Gleichung 2-4}$$

mit der molaren Konzentration  $c = \frac{\text{MRW}}{c}$  in  $[\text{g/ml}]$ .

CD tritt, wie schon erwähnt, bei asymmetrischen Molekülen auf. Aromatische Aminosäuren hingegen weisen in wässriger Lösung keine asymmetrischen Besonderheiten auf und können so auch nicht über Circular dichroismus bestimmt werden. Bei entfalteten oder denaturierten Proteinen zeigen die aromatischen Aminosäuren auch eine freie Beweglichkeit. Ihre Elektronenkonfiguration bleibt symmetrisch und es kann keine unterschiedliche Absorption von LZPL

oder RZPL stattfinden, also tritt auch hier kein CD auf. In einem gefalteten Protein kommen allerdings Effekte zustande, die durch die Umgebung hervorgerufen werden. Durch benachbarte Reste wird den aromatischen Aminosäuren eine asymmetrische Elektronenkonfiguration aufgezwängt, die zum CD führt. Dieser Effekt hängt somit empfindlich vom Faltungszustand des Proteins ab und kann als gutes Indiz für Tertiärstrukturänderungen gesehen werden [Welfle 1999]. Zusätzlich wichtig für die CD-Spektroskopie ist die Asymmetrie der Konformation, die durch die Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und random coil ausgebildet wird und die zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden.

Die CD-Spektren der Proteine können in zwei typische spektrale Bereiche eingeteilt werden. Der Bereich von 160–230 nm ist der sogenannte Peptidbereich, der Bereich von 240–300 nm wird als aromatischer Bereich bezeichnet, weil hier die Eigenschaften aromatischer Aminosäuren eine Rolle spielen. Geringe Überlappungen beider Bereiche sind allerdings möglich. Mit Hilfe synthetisch hergestellter Proteine bekannten Aufbaus, konnte ermittelt werden, wie CD-Spektren von  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und random coil-Strukturen aussehen. Der Einfluss der Sekundärstruktur auf die spektralen Besonderheiten wurde mit Hilfe von CD-Spektren des Poly-L-Lysins untersucht [Myer 1970]. Je nach Milieu bilden sich unterschiedliche Konformationen des Moleküls aus. Es konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -Helix zwei negative Banden bei 208-210 und 222 nm und eine positive Bande bei 192 nm im CD-Spektrum ausbildet. Das  $\beta$ -Faltblatt zeigt ein Minimum bei 216-218 nm und ein Maximum zwischen 195 und 200 nm [Welfle 1999]. In Abbildung 2-12 sind die erhaltenen Spektren dargestellt.

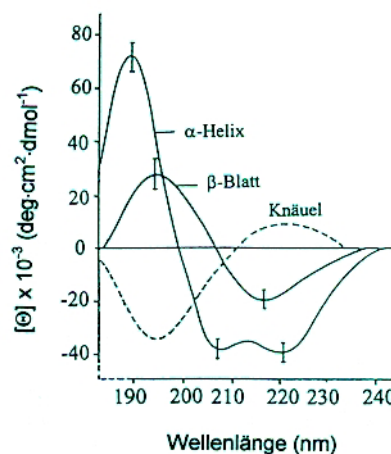


Abbildung 2-12: CD-Spektren der  $\alpha$ -Helix, des  $\beta$ -Faltblattes und der random coil-Strukturen [Welfle 1999].

CD-Spektren werden vielfach eingesetzt, um den  $\alpha$ -Helixanteil von Proteinen zu bestimmen, da diese sehr gut mit Röntgenstrukturdaten korrelieren.  $\beta$ -Faltblattstrukturen treten nicht so regelmäßig auf wie  $\alpha$ -Helices und leisten somit einen geringeren Beitrag zum CD-Spektrum

[Adler et al. 1973]. Aus diesem Grunde wird bei der Untersuchung von Konformationsänderungen der Proteine hauptsächlich die Veränderung des  $\alpha$ -Helixanteils betrachtet.

Nicht nur strukturelle Veränderungen sind mittels CD-Spektren möglich, sondern auch eine quantitative Bestimmung der Sekundärstruktur ist mit geeigneten Softwareprogrammen (Secondary Structure Estimation von der Fa. Jasco) möglich.

### 2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Bradford-Methode wird allgemein als Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen eingesetzt. Grundlegend für diese Bestimmungsmethode ist die Besonderheit des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, in saurem Milieu sein Absorptionsmaximum nach einer Proteinbindung von 465 nm auf 595 nm zu verschieben [Bradford 1976]. Die dissoziierte Form des Farbstoffes geht Wechselwirkungen vor allem mit den basischen und aromatischen Aminosäuregruppen auf der Proteinoberfläche ein und bildet einen farbigen Niederschlag. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm wird innerhalb einer Stunde gemessen und ist ein Maß für die Proteinkonzentration in Lösung. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt anhand einer Kalibriergeraden, die mit Lysozym bekannter Konzentrationen aufgenommen wird.

Coomassie Brilliant Blue G-250 ist eine Triarylmethansulfonsäure mit einem  $pK$ -Wert von  $pH = 1$ , die im Sauren protoniert und im Alkalischen dissoziiert vorliegt. Die undissoziierte Säure ist rot ( $\lambda_{\max} = 474 \text{ nm}$ ), die deprotonierte Form ist blau ( $\lambda_{\max} = 597 \text{ nm}$ ) gefärbt [Jänicke 1997].

Die Bradford-Methode zeigt im Vergleich zu anderen Konzentrationsbestimmungsverfahren für Proteine wie die Lowry- bzw. Biuret-Methode eine geringere Störungsanfälligkeit für Lösungsbestandteile oder Reagenzien [Lucarini und Kilikian 1999].

### 2.2.3 Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA)

Diese gebräuchliche analytische Methode wurde speziell dafür entwickelt, spezifische Kohlenhydrateinheiten an Zellen zu detektieren und zu quantifizieren [McCoy et al. 1984]. Dieses Verfahren gehört zu den wirksamsten Methoden in der Biochemie, um den Nachweis und die Quantifizierung von Enzymen durchzuführen. Der ELLA ist ein analoges Verfahren zum ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), bei dem enzymgekoppelte Reagenzien dazu verwendet werden, spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen mittels Farbreaktion zu erfassen (siehe Abbildung 2-13).

Der Nachweis der Aktivität von natürlichem bzw. rekombinantem ML kann mit der ELLA-Methode bestimmt werden. Die B-Kette ist für den therapeutischen Effekt des Moleküls verantwortlich und vermittelt über das Andocken seiner spezifischen Kohlenhydratbindungsstelle

(Lektin) an die Zielzelle eine erhöhte Zytotoxizität des gesamten Mistellektinmoleküls (siehe Abschnitt 2.1.6). Die Aktivität dieser neuraminsäure- und galaktosespezifischen Bindungsstelle wird bei diesem ELLA-Testverfahren bestimmt.

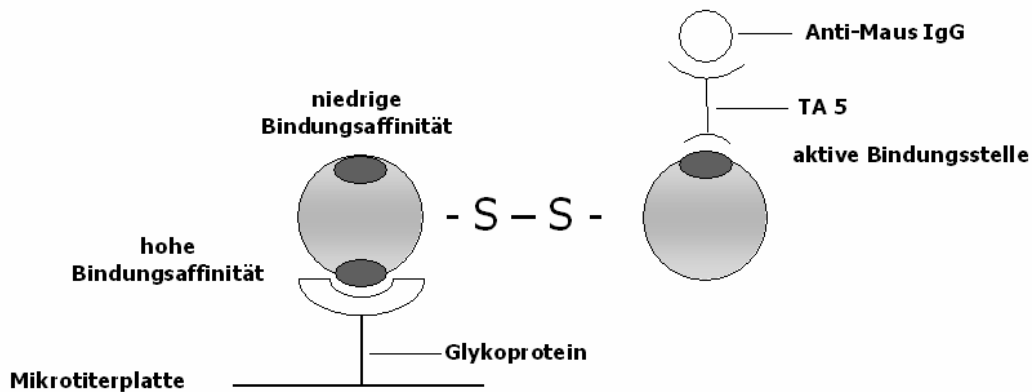


Abbildung 2-13: Schematische Darstellung des ELLA mit Mistellektin.

Dabei wird die Mikrotiterplatte mit dem Glykoprotein Asialofetuin beschichtet, das spezifisch mit der Lektinbindungsstelle der ML-B-Kette interagiert [Vang et al. 1986]. Anschließend werden unspezifische freie Bindungsstellen mit BSA abgesättigt. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe bindet sich die B-Kette über ihre Lektinbindungsstelle an das Glykoprotein. Das Mistellektin wird somit auf der Platte fixiert. Nach Abwaschen überschüssiger Probenlösung, wird der monoklonale Maus-Antikörper TA 5 hinzugegeben, der sich spezifisch an die A-Kette des bereits gebundenen Mistellektins bindet. Ein zweiter Antikörper, Anti-Maus-IgG, der mit einer Peroxidase markiert ist, wird dem ersten Komplex hinzugefügt. Diese Peroxidase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff in Gegenwart des hinzugefügten Elektronendonors Tetramethylbenzidin (TMB). Dieser wird bei der Reaktion oxidiert, was durch einen Farbumschlag nach blau sichtbar wird. Nach Zugabe von Schwefelsäure wird die Reaktion gestoppt und bei 450 nm sofort photometrisch vermessen. Aufgrund der besonderen Durchführung dieser Methode handelt es sich um einen sogenannten Sandwich-Test (siehe Abbildung 2-13), bei dem ausschließlich Moleküle nachgewiesen werden können, die in ihrer intakten dimeren Molekülstruktur vorliegen.

## 2.3 Primärpackmittel für Proteinformulierungen

### 2.3.1 Glas

Der Werkstoff Glas wird in der Pharmazie sehr häufig als Primärpackmittel (PPM) für die Lagerung von flüssigen Zubereitungen gewählt. Da diese Behältnisse direkt mit dem Arzneimittel in Kontakt stehen, bedürfen sie besonderen Anforderungen. Die gelagerten Zubereitungen müssen vor äußeren Einflüssen wie Luft, Licht und Feuchtigkeit und mikrobieller Verunreinigung geschützt sein. Zusätzlich sollten keine Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff und PPM stattfinden [Peters 1985, Algner et al. 1984].

Glas ist ein amorpher anorganischer Feststoff. Thermodynamisch wird Glas auch als unterkühlte Schmelze bezeichnet, die als glasiger Festkörper erstarrt. Während Schmelzen bei Unterschreitung ihres Schmelzpunktes auskristallisieren, erstarren Glasschmelzen beim schnellen Abkühlen ohne Kristallisation. Die Bildung von Kristallkeimen bei der Erstarrung der Schmelze zum Glas findet zwar statt, allerdings verbleibt für den Kristallisationsprozess durch das schnelle Abkühlen nicht mehr ausreichend viel Zeit. Ursache für das Fehlen einer Kristallisation ist ein starker Viskositätsanstieg beim Abkühlen, der durch die dreidimensionale Vernetzung der molekularen Bausteine erfolgt [Vogel 1992]. Bei vielen Glasarten kann die Glasübergangstemperatur  $T_g$  bei fast 600 °C liegen.

#### 2.3.1.1 Struktur

Chemische Stoffe besitzen die Fähigkeit zur Glasbildung, wenn sie in der Lage sind, - unter bestimmten technologischen Voraussetzungen - spezifische Netzwerke auszubilden. Diese netzwerkbildenden Bausteine sind vorrangig Silizium-, Bor-, Phosphor- und Arsenoxide, die über Sauerstoffbrücken miteinander vernetzt sind [Pfaender 1997]. Den Hauptbestandteil des Glases bildet Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ). Es besitzt das Vermögen, ein tetraedrisches Netzwerk auszubilden. Abbildung 2-14 zeigt eine zweidimensionale Darstellung des Netzwerkes [Pfaender 1997]. Zusätzlich können sogenannte Netzwerkmodifikatoren wie Natrium- oder Kaliumoxide, die die Struktur aufweiten, ionisch eingebunden werden, und so das Glas leichter schmelzen lassen.

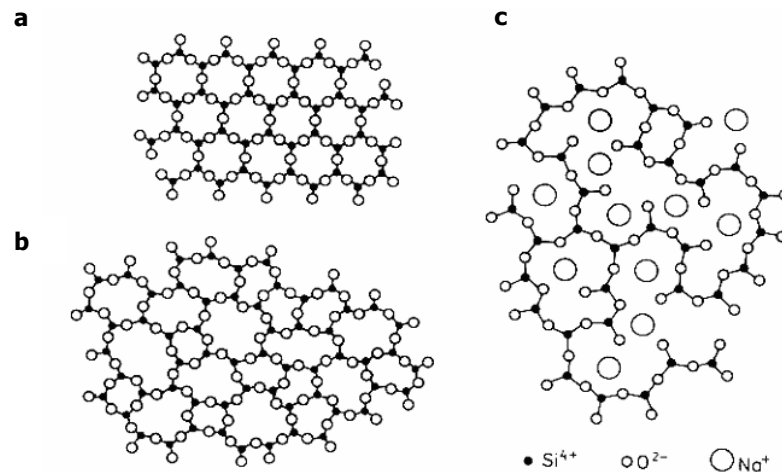


Abbildung 2-14: Zweidimensionale Darstellung von  $\text{SiO}_4$ -Netzwerken: **a** regelmäßige  $\text{SiO}_4$ -Tetraeder in Silikatkristallen, **b** unregelmäßige Silikatglasstrukturen, **c** Natriumsilikatglas [aus Bauer et al. 2002].

### 2.3.1.2 Chemische Eigenschaften

Glas für den pharmazeutischen Gebrauch muss den höchsten Reinheitsanforderungen entsprechen, damit es nicht zu einer Auslaugung von Glasbestandteilen und zu einer Verunreinigung des Arzneimittels kommt. Die Folge wäre eine Anreicherung bestimmter Ionen, die eine Zerstörung des Arzneimittels bewirken können. Die chemische Beständigkeit des PPM Glas in der Pharmazie ist somit von höchster Bedeutung. Sie wird definiert als die Widerstandsfähigkeit einer Glasoberfläche gegenüber chemischen Agenzien. An dieser Reaktion sind immer Wasser bzw. seine Dissoziationsprodukte, Protonen ( $\text{H}^+$ ) und Hydroxid-Ionen ( $\text{OH}^-$ ) beteiligt. Welche Reaktionen an der Glasoberfläche ablaufen können, ist in Abbildung 2-15 dargestellt.

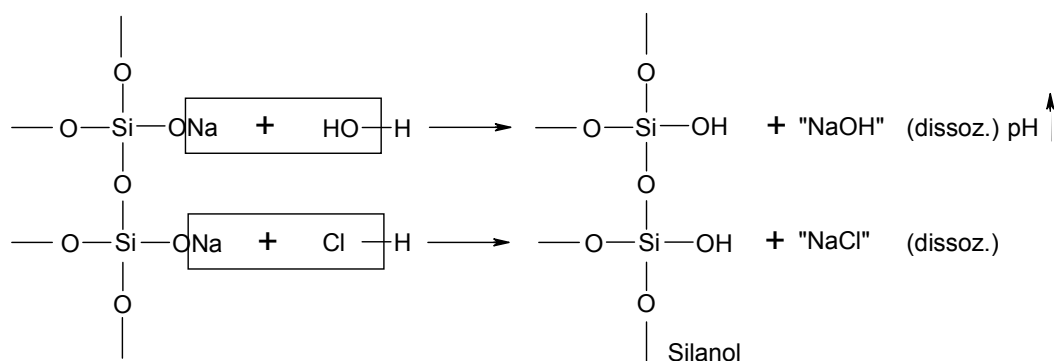


Abbildung 2-15: Reaktionen an der Glasoberfläche durch hydrolytischen oder sauren Einfluss: Ionenaustausch und Bildung von Silanol-Gruppen [aus Bauer et al. 2002].

Bei Kontakt mit Wasser oder Säure werden geringe Mengen ein- und zweiwertiger Kationen (Alkali-Ionen) herausgelöst (Auslaugung des Glases), die gegen Protonen des Lösungsmittels ausgetauscht werden (siehe Abbildung 2-15). Diese Reaktion hat einen Anstieg des pH-Wertes zur Folge. Die Angriffswirkung von Laugen auf Glas ist stärker als die von Säuren bzw. Wasser. Dabei wird das Silikatnetzwerk aufgebrochen und die Oberfläche abgetragen (siehe Abbildung 2-16). Elektrolyte, die sich zusätzlich in der Lösung befinden können, bewirken einen teilweisen Kationenaustausch.

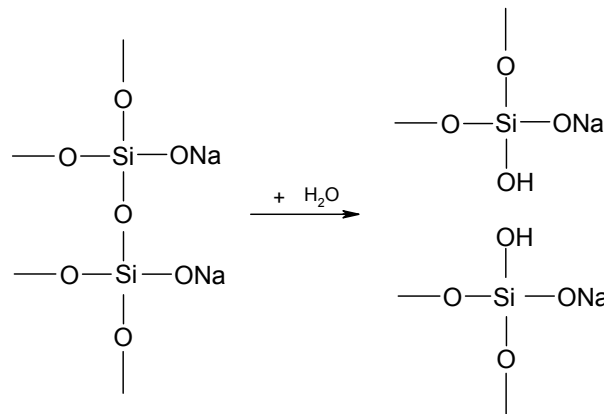


Abbildung 2-16: Alkalische Beanspruchung: Zerstörung des Silikatgerüsts unter Sprengung der Silanol-Gruppen [aus Bauer et al. 2002].

Organische bzw. wasserfreie Lösungen gehen keine Interaktionen mit der Glasoberfläche ein und führen somit nicht zu den oben angegebenen Reaktionen.

### 2.3.1.3 Hydrolytische Resistenz

Entsprechend dem Pharmazeutischen Arzneibuch werden mit Hilfe der hydrolytischen Resistenz vier Glasqualitäten unterschieden. Tabelle 2-2 zeigt einen Überblick über die einzelnen Glasarten.



Tabelle 2-2: Übersicht der verschiedenen Glasarten [nach Europäischem Arzneibuch 2005]

Hydrolytische Klasse	Bezeichnung der Glasart	Verwendung
<b>I</b>	Neutralglas mit hoher hydrolytischer Resistenz, z.B. Borosilikatgläser.	Hochempfindliche Parenteralia, Mehrfachverwendung möglich.
<b>II</b>	Oberflächenvergütetes Normalglas mit hoher hydrolytischer Resistenz, z.B. Natronkalksilikatglas.	Saure und neutrale Zubereitungen, einschließlich Parenteralia als Einmalbehältnisse verwendbar.
<b>III</b>	Normalglas mit mittlerer hydrolytischer Resistenz, Natronkalksilikatglas.	Parenterale Pulver oder flüssige nicht wässrige Parenteralia.
<b>IV</b>	Natronkalkgläser mit geringer hydrolytischer Resistenz.	Für feste und einige flüssige oder halbfeste Zubereitungen, nicht für Parenteralia geeignet.

#### 2.3.1.4 Beschichtete Glasoberflächen

Otto Schott hat im Jahre 1892 den Einsatz von Borosilikatgläsern für die pharmazeutische Industrie möglich gemacht [Pfaender 1997]. Diese auch als Neutralglas bezeichnete Glasart besitzt eine hohe hydrolytische Resistenz durch den Austausch des Natriumanteils gegen Bortrioxid ( $B_2O_3$ ) und Aluminiumoxid ( $Al_2O_3$ ). Dadurch ergibt sich für Borosilikatgläser eine hohe chemische Beständigkeit und eine relativ geringe Wärmeausdehnung und somit gute Temperaturbelastbarkeit. Der prozentuale Anteil an Netzwerkbildnern liegt bei 70-80 %  $SiO_2$ , 11-12 %  $B_2O_3$ .  $Al_2O_3$  (2-4 %) lässt das Glas nicht so spröde werden. Den restlichen Anteil bilden Alkali- und Erdalkali-Ionen, die ionisch in das Netzwerkgerüst eingebunden werden und die Schmelztemperatur senken. Die Zusammensetzung und das Verhältnis der einzelnen Bestandteile kann je nach Hersteller unterschiedlich sein.

Einsatz finden Borosilikatgläser als PPM für hochempfindliche Parenteralia, Blut und Blutprodukte. Eine Mehrfachverwendung ist erlaubt. Da diese Gläser laut Arzneibuch die Anforderungen der hydrolytischen Klasse I erfüllen müssen, werden sie auch als Typ I-Gläser bezeichnet.

## Oberfläche

Type I plus<sup>®</sup> ist ein Borosilikatglas, das durch ein von der Firma Schott entwickeltes spezielles Verfahren beschichtet wird. Die Oberfläche des Typ I-Glases wird durch das von Schott entwickelte *Plasma Impulse Chemical Vapour Deposition-Verfahren* (PICVD) modifiziert. Dabei wird die Glasoberfläche mit einem Gasgemisch aus Silizium und Sauerstoff begast und durch Mikrowellenenergie ein Plasma gezündet, um somit die Oberfläche zu aktivieren. Unter einem Plasma wird ein (teil)ionisiertes Gas verstanden, das neben neutralen Gasmolekülen auch freie Elektronen und Kationen enthält. Die Elektronen im Plasma brechen die Siliziumverbindungen auf. Positive Siliziummonoxid-Ionen reagieren an der Glaswand mit überschüssigem Sauerstoff zu Siliziumdioxid, das sich dann als quarzähnliche Schicht abscheidet. Zyklische Wiederholungen dieses Vorganges bewirken eine mehrschichtige Ablagerung, welche eine homogene und dichte hydrophile Beschichtung garantiert. Diese Technologie bietet die Möglichkeit, beschichtete Gläser für parenterale Zubereitungen zu produzieren. Die Ionenfreisetzung dieser Gläser ist so gering, dass die nötigen Anforderungen des Arzneibuches für Gläser zur Lagerung von Parenteralia sogar übertroffen werden.

Diese Gläser sind für Zubereitungen geeignet, die gegenüber pH-Änderungen oder Ionen empfindlich sind oder für Wirkstoffe, die dazu neigen, Komplexe zu bilden oder niedrig dosiert sind. Dieses spezielle Beschichtungsverfahren ermöglicht die Lagerung dieser Formulierungen.

## Oberflächenstruktur

Das Silikonisieren verändert das Adsorptionsverhalten von Oberflächen in hohem Maße. Die wichtigste Eigenschaft ist der Wasser abweisende Charakter dieses Materials [Alberstetter und Roth 2003]. Durch eine verminderte Benetzung werden Interaktionen zwischen Arzneistofflösung und Behältnisoberfläche vermindert.

Eine Oberflächenvergütung durch Silikonisieren kann durch Aufdampfen von Silanen oder durch Besprühen mit Silikonölen oder –emulsionen erfolgen. Der Nachteil dieser Vergütung ist, dass sie nach mehrmaligem Gebrauch wieder verloren geht.

Das neuartige Type I plus<sup>®</sup>-Glas wird für diese Arbeit mit und ohne zusätzlicher Silikonbeschichtung als PPM eingesetzt.

### 2.3.2 Kunststoffe

Kunststoffe sind Polymere, die seit einigen Jahren als PPM zum Einsatz kommen. Ihre Eigenschaften lassen sich durch verschiedene Herstellungsbedingungen und Zusätze, wie Weichmacher, Stabilisatoren, Füllstoffe oder Pigmente, modifizieren und steuern [Bauer et al.

2002]. Ein für diese Arbeit interessanter Kunststoff ist Topas<sup>®</sup>, auf den im Folgenden näher eingegangen wird.

Topas<sup>®</sup> ist ein von der Firma Ticona neu entwickeltes Cycloolefin Copolymer (COC) von hoher Reinheit und sehr guten chemischen und physikalischen Eigenschaften. In Abbildung 2-17 ist die Struktur des COC dargestellt.

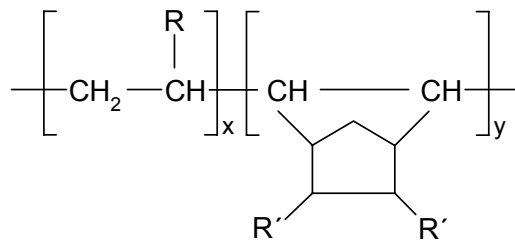


Abbildung 2-17: Schematische Darstellung des Cycloolefin Copolymer Topas<sup>®</sup> [Schott 2006].

COC ist ein Copolymer aus Ethylen und einem zyklischen, typischerweise vom Dicyclopentadien abgeleiteten, Olefin.

Topas<sup>®</sup> besitzt eine hohe hydrolytische Resistenz, sehr gute Barriereigenschaften, die Möglichkeit der Sterilisation, eine glasähnliche Transparenz und wenig Gewicht. Durch die hohe hydrolytische Resistenz ist das Herauslösen von Ionen und Schwermetallen außergewöhnlich gering. Die Adsorptionsaffinität von Topas<sup>®</sup> soll laut Herstellerangaben gering sein [Schott 2006]. Aus diesem Grund wird Topas<sup>®</sup> mit und ohne zusätzlicher Silikonisierung für diese Arbeit als PPM verwendet.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Proteine

##### **Lysozym**

Die Mucopolysaccharidase Lysozym (Charge: 051K7028) besitzt eine Molekularmasse von 14310 Da und dient in dieser Arbeit als Modellprotein.

Es wird als Lyophilisat von der Firma Sigma-Aldrich (D-Steinheim) bezogen. Lysozym wird aus Hühnereiweiß gewonnen, das dreifach kristallisiert, anschließend dialysiert und lyophilisiert wird. Der Proteinanteil beträgt ca. 95 %.

##### **Rekombinantes Mistellektin I (rML I)**

Bei rML I (Syn. rViscumin) handelt es sich um ein rekombinant hergestelltes Mistellektin mit einer Molekularmasse von 56 kDa, das freundlicherweise von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF)\* (D-Braunschweig) zur Verfügung gestellt wird.

#### 3.1.2 Hilfsstoffe

Die im Folgenden aufgeführten Hilfsstoffzusätze werden den wässrigen Proteinlösungen hinzugesetzt, um den Einfluss dieser Stoffe auf die Proteinkonformation zu untersuchen.

##### **Natriumchlorid**

Natriumchlorid (NaCl) wird in extra reiner Form (für Analysezwecke) von der Firma Merck (D-Darmstadt) geliefert und in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

##### **Phosphatpuffer**

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Proteinstruktur zu untersuchen, werden Phosphatpuffer (PBS) unterschiedlicher pH-Werte nach Europäischem Arzneibuch (2002) hergestellt.

Für die Herstellung der Phosphatpufferlösungen pH 4,5, pH 5,5 und pH 6,5 werden Kaliumdihydrogenphosphat R, Natriummonohydrogenphosphat R und Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat R von der Firma Merck (D-Darmstadt) verwendet.

Der Phosphatpuffer pH 7,4 wird mit PBS Tablets von der Firma ICN Biomedicals Inc. (U.S.A.-Ohio) hergestellt.

---

\* Neuer Name: Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI)

### Poloxamer 407

Beim Poloxamer 407 (Syn. Pluronic<sup>®</sup> F127, Lutrol<sup>®</sup> F127) handelt es sich um ein synthetisches Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymerisat mit einer relativen Molekularmasse von 9840-14600 Da von der Firma Dologiet (D-St. Augustin/Bonn) in Arzneibuchqualität [Europäisches Arzneibuch 2005]. Abbildung 3-1 zeigt die Strukturformel.

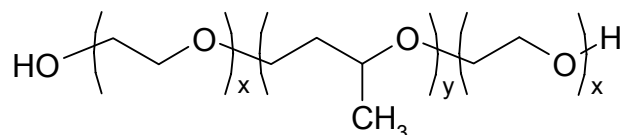


Abbildung 3-1: Strukturformel von Poloxamer 407 (x = 95-105, y = 54-60)

Die verwendete Konzentration des Emulgators liegt mit 0,001 % unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) [Kabanov et al. 2002].

### Polysorbat 80

Polysorbat 80 (Syn. Tween 80) zählt zu der Gruppe der nichtionischen Tenside mit einer molekularen Masse von 1310 Da und wird von der Firma Brenntag (D-Mühlheim a.R.) bezogen. Polysorbat 80 ist ein Polyoxyethylen-20-Sorbitanfettsäureester, der sich aus einer Mischung von Partialestern des Sorbitans und seiner Anhydride mit Fettsäuren zusammensetzt, die mit 20 mol Ethylenoxid pro mol Sorbitan copolymerisiert sind (siehe Abbildung 3-2). Tween 80 ist ein sterischer O/W-Emulgator und Lösungsvermittler mit geringer Toxizität (Fiedler 1996). Der HLB-Wert beträgt 15, die CMC liegt bei 0,002 % (m/v). Polysorbate sind als Hilfsstoffe in oralen und parenteralen Zubereitungen zugelassen [Rote Liste 2006] und werden Protein-arzneistofflösungen üblicherweise zugesetzt, um Adsorptionen des pflanzlichen Arzneistoffes an Oberflächen zu verringern.

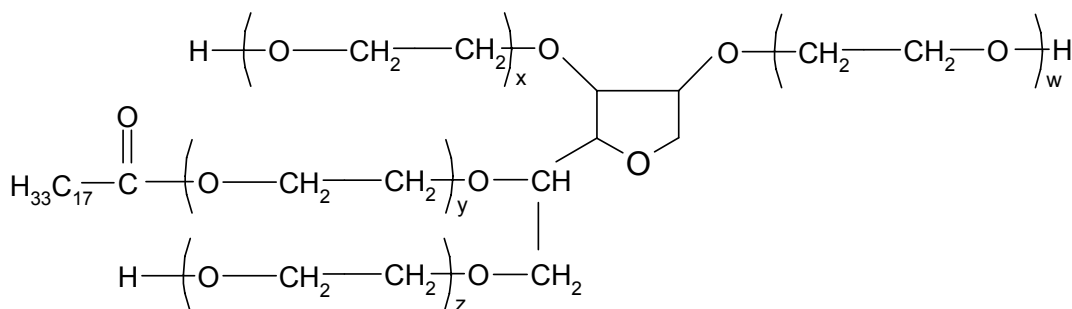


Abbildung 3-2: Strukturformel von Polysorbat 80 (w + x + y + z = 20).

### Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Polyvinylpyrrolidon (Syn. Kollidon<sup>®</sup> 30), im Folgenden auch als PVP bezeichnet, wird von der Firma BASF AG (D-Ludwigshafen) bezogen und in einer Konzentration von 0,025 % (m/v) eingesetzt. Höhere Konzentrationen führen zu Problemen bei der Bestimmung der Konformationsänderung mittels Circular dichroismus. PVP besitzt ein Molekulargewicht von 55 kDa. Abbildung 3-3 zeigt die Strukturformel.

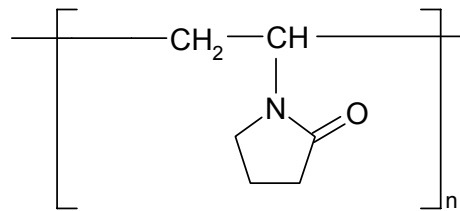


Abbildung 3-3: Strukturformel von Polyvinylpyrrolidon.

### Wasser

Es wird ausschließlich Wasser in bidestillierter, sterilisierter Qualität verwendet.

### Sonstige Materialien

Weitere Materialien, die ausschließlich bei nachfolgend beschriebenen Methoden zur Anwendung kommen, werden im entsprechenden Methodenteil berücksichtigt.

#### 3.1.3 Primärpackmittelmateriale

### Glasperlen

Bei den eingesetzten Perlen handelt es sich um massive Natronkalk-Silikat-Glasperlen mittlerer hydrolytischer Resistenz, die in einem kontinuierlichen Schmelzverfahren mit anschließender materialschonender Gleitschliffpolitur hergestellt werden. Sie besitzen einen Durchmesser in einem Größenbereich von 0,25–0,5 mm und werden von der Firma Roth (D-Karlsruhe) bezogen. Die Oberfläche der Glasperlen beträgt 77,3 cm<sup>2</sup>/g. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3-1 aufgeführt:

Tabelle 3-1: Chemische Zusammensetzung der Glasperlen (Angaben lt. Roth)

Material	Prozentualer Anteil
SiO <sub>2</sub>	72 %
Na <sub>2</sub> O	13 %
CaO	9 %
MgO	4 %
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1 %
K <sub>2</sub> O, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1 %

### Topas® Granulat

Topas® ist ein zyklisches Olefin-Copolymer aus Ethylen- und zyklischen Olefin-Einheiten (Strukturformel siehe Abbildung 2-17), das freundlicherweise von der Firma Schott forma vitrum (CH-St. Gallen) zur Verfügung gestellt wird. Die Oberfläche des Granulates beträgt 38,7 cm<sup>2</sup>/g.

Die Glasperlen und das Granulat werden den verschiedenen Proteinlösungen hinzugefügt, um ein größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis zwischen Protein und Oberfläche zu erhalten.

### Type I plus® Standard Behältnisse

Alle Gefäße besitzen ein Füllvolumen von 10 ml und werden freundlicherweise von der Firma Schott forma vitrum (CH-St. Gallen) zur Verfügung gestellt. Die Gefäße werden mit teflonbeschichteten Septen verbördelt (Neolab, D-Heidelberg).

Type I plus® Standard Behältnisse bestehen aus einem Borosilikatglas (Glasart I) mit einer hohen hydrolytischen Resistenz, die zusätzlich auf ihrer inneren Oberfläche mit SiO<sub>2</sub> beschichtet werden.

### Silikonisierte Type I plus® Behältnisse

Bei diesen Behältnissen handelt es sich auch um Type I plus® Gläser der Glasart I mit einer SiO<sub>2</sub>-Beschichtung, die aber noch zusätzlich mit Silikon beschichtet werden. Diese weitere Silikonisierung erfolgt bei 320 °C für 15 Minuten.

**Typ I-Glas Behälternisse**

Bei diesem Glas handelt es sich auch um ein Borosilikatglas (Glasart I) mit einer hohen hydrolytischen Resistenz ohne eine zusätzliche Beschichtung.

**Topas<sup>®</sup> Behälternisse**

Die verwendeten Flaschen werden aus dem oben beschriebenen Topas<sup>®</sup>-Granulat gefertigt.

**Silikonisierte Topas<sup>®</sup> Behälternisse**

Diese Behälternisse entsprechen den oben beschriebenen Topas<sup>®</sup> Gefäßen. Sie werden noch zusätzlich bei 100 °C mit Silikon beschichtet.



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herstellung der Proteinlösungen

Für die Herstellung der Lysozym-Stammlösungen (1 mg/ml) wird das Enzym in sterilisiertem, bidestilliertem Wasser bzw. in der wässrigen Lösung der jeweils zu untersuchenden Hilfsstoffe mit Hilfe eines Vortex-Rührers (Scientific Industries Inc., U.S.A-New York) gelöst. Diese Stammlösung wird anschließend weiter auf 100 µg/ml verdünnt. Die komplette Herstellung der Proteinlösungen wird in Polypropylen-Gefäßen durchgeführt, um eine Proteinadsorption an Glas zu vermeiden. Die Ansatzgröße beträgt mindestens 100 ml.

### 3.2.2 Lagerung der Proteinlösungen

1 ml jeder Lysozymlösung wird bis zu 14 Tage bei Raumtemperatur (20 °C) in Reaktionsgefäßen aus Polypropylen gelagert. Die Lagerung erfolgt mit und ohne Zusatz von 500 mg Glasperlen bzw. Topas® Granulat.

Um den Einfluss der Oberflächen der verschiedenen Originalgefäße zu untersuchen, werden 5 ml Proteinlösung in jedes Probengefäß gefüllt und anschließend bis zu 14 Tage bei Raumtemperatur unter Bewegung gelagert. Eine Kontamination des Stopfens erfolgt dabei nicht.

### 3.2.3 Circular dichroismus (CD)

Die Veränderung der Sekundärstruktur der Proteine wird mit einem Spektralphotometer J715 (JASCO, D-Groß-Umstadt) durchgeführt. Die CD-Spektren werden bei Raumtemperatur zwischen 180 und 260 nm in einer optischen Spezial-Quarzglas-Küvette QX Suprasil 300 (Hellma, D-Müllheim/Baden) mit 1 mm Schichtdicke durchgeführt. Jedes erhaltene Spektrum berechnet sich aus 6 wiederholten Scans, korrigiert durch Subtraktion des Blindwertes. Der Helixanteil wird mit Hilfe der Auswertungssoftware Secondary Structure Estimation der Firma JASCO unter Angabe der eingesetzten Proteinkonzentration und der Küvetten-Schichtdicke nach der Yang-Gleichung berechnet [Chen und Yang 1971].

### 3.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Reagenzlösung wird laut Bradford (1976) folgendermaßen hergestellt:

100 mg Serva Blue G (Serva Electrophoresis, D-Heidelberg) werden in 50 ml Ethanol 95 % vollständig gelöst und anschließend mit 100 ml Phosphorsäure 85 % (m/v) versetzt. Diese Lösung wird dann mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und vor ihrer Verwendung immer frisch filtriert.

In eine 96-well Mikrotiterplatte (Nunc, DK-Roskilde) werden 150 µl der Protein- bzw. Standardlösung pro Well pipettiert und anschließend mit 150 µl des Bradford-Reagenzes versetzt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wird die Extinktion der entstandenen blauen Färbung mit dem Mikrotiterplatten-Reader PowerWave XS (Bio-Tek Instruments GmbH, D-Bad Friedrichshall) bei 595 nm vermessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wird eine Kalibriergerade mit Lysozym in einem Konzentrationsbereich von 2,5–100 µg/ml aufgenommen. Die Absorptionen der Lysozym-Standardlösungen werden gegen die Proteinkonzentrationen aufgetragen und die Gerade mit Hilfe der linearen Regression errechnet. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $R^2=0,995$ . Aus der Kalibriergeraden und der gemessenen Absorption der Probenlösungen werden die Proteinkonzentration in den Probenlösungen mit Hilfe der Auswertungssoftware KC4™ (Bio-Tek Instruments GmbH, D-Bad Friedrichshall) bestimmt. Für die Standard- und Probenlösungen werden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Dabei ist die Wiederfindungsrate unmittelbar nach der Herstellung bei einem Lysozym-Sollgehalt von 0,1 mg/ml häufig < 100 %. Aus diesem Grund wird die ermittelte Proteinkonzentration (siehe Anhang) am Tag der Herstellung ( $t=0$ ) als 100 % gesetzt und der Lysozymgehalt [%] gegen die Lagerungszeit aufgetragen. Obwohl visuell meist nicht erkennbar, scheint eine Aggregation bzw. Ausfällung des Proteins stattzufinden, die teilweise durch Wechselwirkungen an Fest-Flüssig-Grenzflächen begünstigt wird [Wang 2005].

### 3.2.5 Aktivitätsbestimmung von Lysozym

Lysozym katalysiert die Hydrolyse von Polysaccharidketten. Mit Hilfe einer fluorimetrischen Methode wird die Aktivität des Lysozyms während der Lagerung bestimmt [John 1992].

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird als Substrat ein nicht fluoreszierender Ester, 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-N,N',N''-triacetylchitotriosid ((GlcNAc)<sub>3</sub>-MeU) (Fluka, CH-Buchs), verwendet. Dieser setzt erst nach der Hydrolyse einen Fluorophor, das 4-Methylumbelliferron (4-MeU) frei und weist ein Emissionsmaximum bei 450 nm auf, wenn er mit Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm angeregt wird [Yang und Hamaguchi 1980]. Abbildung 3-4 zeigt die Aktivitätsbestimmung schematisch.

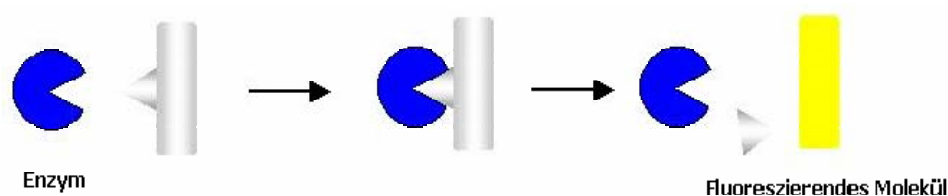


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Aktivitätsbestimmung mittels Fluorimetrie.

100 µl Untersuchungslösung werden pro Well in eine sterile, schwarze 96-well Mikrotiterplatte (Nunc, DK-Roskilde) gegeben und nach Zugabe von 100 µl Substratlösung, (GlcNAc)<sub>3</sub>-MeU (6 µM in Natriumacetat-Puffer (20 mM und 0,1 M NaCl), pH 5,1), 10 Sekunden geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde beim Temperaturoptimum des Enzyms (40 °C) wird die Hydrolyse mit 150 µl Glycin Puffer (pH 10) gestoppt. Die Herstellung und das Pipettieren der Substratlösung werden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

Die Fluoreszenzspektren werden mit dem Fluoreszenz-Spektralphotometer Mikrotiterplatten-Reader Genios (Tecan Deutschland GmbH, D-Crailsheim) aufgenommen. Das nach der Spaltung entstehende fluoreszierende 4-MeU emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 450 nm, wenn die Anregungswellenlänge 356 nm beträgt. Mit Hilfe der Auswertungssoftware Magellan (Tecan Deutschland GmbH, D-Crailsheim) wird die relative Fluoreszenzeinheit (RFU) der Standard- bzw. Probenlösungen bestimmt, die dann auf die jeweilige eingesetzte Proteinkonzentration bezogen wird.

### 3.2.6 Herstellung von rekombinantem Mistellektin I

Die Herstellung des rML I erfolgt durch eine DNA-rekombinationstechnische Methode in *E.coli*-Bakterien nach der Methode von Eck et. al (1999 a, 1999 b), wobei die beiden Einzelketten getrennt voneinander synthetisiert werden. Die Verknüpfung der A- und B-Untereinheit zur Bildung des nativen globulären Proteins erfolgt durch ein Redox-System (Gluthation-Proteindisulfidomerase). Die Ausbeute beträgt ca. 10 % [Gloger 2002]. Nach einer Aufkonzentrierung und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Sephadex Säule) wird das rML I in Diafiltrationspuffer pH 8 gelöst und bei -70 °C eingefroren.

rML I wird freundlicherweise von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF, D-Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

### 3.2.7 Aktivitätsbestimmung von rML I mittels Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA)

Die Aktivität des kohlenhydratbindenden rViscumins wird mit Hilfe des Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA) in Anlehnung an Eck et al. (1999 b) durchgeführt.

#### 3.2.7.1 Plattenvorbereitung

Die Mikrotiterplatte (Nunc, DK-Roskilde) wird mit dem Glykoprotein Asialofetuin (Sigma-Aldrich, D-Steinheim) beschichtet, das spezifisch für die Lektinbindungsstelle des rViscumins ist. Um die Glykoproteinmatrix zu fixieren, werden 100 µl einer 100 µg/ml Lösung von Asialofetuin in einem kochsalzhaltigen Phosphatpuffer (PBS/NaCl) (13 mM PBS, 128 mM NaCl, pH 7,4) in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Platte gewaschen (Columbus Microtiterplatten

Washer, Tecan Deutschland GmbH, D-Crailsheim). Bei dem Waschpuffer handelt es sich um den oben angeführten PBS/NaCl-Puffer pH 7,4, der zusätzlich 0,1 % Tween 20 (Merck, D-Darmstadt) enthält. Um unspezifische freie Bindungsstellen der Platte zu blockieren, wird jedes Well mit 200 µl einer Lösung aus PBS/NaCl/0,1 % Tween 20 und 1 % Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, D-Steinheim) (m/v) versetzt und für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank B 6030 (Heraeus instruments, D-Hanau) gelagert. Anschließend wird die Platte erneut mit dem Waschpuffer gewaschen.

### *3.2.7.2 Probenvorbereitung*

Als Standard wird rekombinantes Mistellektin I (rML I) (GBF, D-Braunschweig) verwendet. Es wird eine Stammlösung mit 250 ng/ml in Phosphatpuffer pH 7,4 hergestellt, dem 0,05 % BSA (m/v) (Verdünnungspuffer) zugesetzt sind. Die eingesetzten Konzentrationen der Standardreihe liegen zwischen 10 und 250 ng/ml.

Die zu untersuchenden Proben werden 1:10 verdünnt. Es werden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### *3.2.7.3 Versuchsdurchführung*

Die mit Asialofetuin fixierte und abgesättigte Platte wird mit je 100 µl Probe- bzw. Standardlösung pro Well versetzt und anschließend über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank (Liebherr, D-Ochsenhausen) inkubiert. Nach einem Waschvorgang wird jede Kavität der Platte mit 100 µl des monoklonalen Detektionsantikörpers TA-5 (BRAIN, D-Zwingenberg) (1:2500 verdünnt mit PBS/NaCl + 0,1 % BSA (m/v) + 1 % Triton X100 (Merck, D-Darmstadt)) versetzt. Nach zweistündiger Lagerung bei 37 °C und dreimaligem Waschen wird den Wells jeweils 100 µl eines zweiten monoklonalen Antikörpers, Anti-Maus IgG-Peroxidase-Konjugat (Sigma-Aldrich, D-Steinheim) (1:3500 Verdünnung in PBS/NaCl + 0,1 % Tween 20), zugesetzt. Dieses Konjugat verbleibt eine Stunde bei 37 °C auf der Platte und wird anschließend mit dem Waschpuffer wieder entfernt. 100 µl Detektionssubstrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) (Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln) werden in jedes Well pipettiert und wirken 15 Minuten bei 37 °C im Dunkeln ein. Anschließend wird die Reaktion mit 100 µl 20 %iger (m/m) Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion sofort bei 450 nm vermessen.

## **3.2.8 Bestimmung der Carbohydratbindungsspezifität des Mistellektins**

Um die Empfindlichkeit des ELLA für rViscumin zu verbessern, wird die sonst eingesetzte Asialofetuin-Matrix durch andere Bindungspartner (Glykoproteine) ersetzt. Eingesetzt wird Haptoglobin aus menschlichem Plasma vom Phänotyp 1.1 und 2.2 und eine Mischprobe aus verschiedenen Haptoglobinen (Haptoglobin pooled) (Sigma-Aldrich, D-Steinhafen), die

freundlicherweise von der Firma VISCUM AG (D-Zwingenberg) zur Verfügung gestellt werden [Kurosky et al. 1980].

Bestimmt werden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für rML analog des oben beschriebenen ELLA (siehe Abschnitt 3.2.7). Es werden für jede rViscumin-Konzentration (0,2 – 200 ng/ml) achtfach-Bestimmungen durchgeführt. Das Kriterium für die Nachweisgrenze wird auf ein Signal/Rausch-Verhältnis  $\geq 5$  festgelegt. Die relative Standardabweichung für die Bestimmungsgrenze wird üblicherweise  $\leq 10\%$  definiert [Wätzig et al. 1998, Wätzig 2002].

### 3.2.9 Hemmtest und Testselektivität

Die Selektivität einer analytischen Testmethode gibt an, bis zu welchem Ausmaß diese Methode geeignet ist, einen Analyten in einer Matrix ohne Störungen der anderen Komponenten zu bestimmen. Bei dieser Testanordnung wird die spezifische Bindung einer bestimmten Menge rViscumin an verschiedenen Glykoproteinmatrices in Anwesenheit von  $\beta$ -D-Lactose bestimmt (Sigma-Aldrich, D-Steinhafen). Abweichend von dem Versuchsablauf unter 3.2.7, werden 100  $\mu$ l rML (100 ng/ml) untersucht. Um die Selektivität zu untersuchen, werden die Proben zusätzlich mit  $\beta$ -D-Lactose (0 – 140 mM) inkubiert. Anders als bei der Inkubation der Proben, die unter 3.2.7 beschrieben ist, beträgt die Inkubationszeit nach der Beladung der Mikrotiterplatte mit rML I und  $\beta$ -D-Lactose 2 Stunden bei 37 °C.

Die rML I-Bindung an die verschiedenen Matrices wird gegen den Logarithmus der Hemmkonzentration von  $\beta$ -D-Lactose aufgetragen. Die Konzentration des Inhibitors, die eine 50 %ige Bindungsreduktion bewirkt, wird grafisch für jedes Glykoprotein ermittelt und als  $IC_{50}$  bezeichnet. Der  $IC_{50}$ -Wert wird ausgewählt, um die untersuchten Glykoproteine miteinander zu vergleichen.

### 3.2.10 Verbesserung des Enzyme Linked Lectin Assays

Neuere Studien des Testverfahrens zeigen, dass rekombinantes Mistellektin eine verminderte Affinität gegenüber Asialofetuin, einem desialysierten Glykoprotein, jedoch eine hohe gegenüber dem Sialofetuin zeigt [Wu et al. 1995, Frantz et al. 2000, Müthing et al. 2004 und 2005]. Aus diesem Grund wird eine Verbesserung der Testsensitivität angestrebt. Untersucht werden Haptoglobin vom Phänotyp 1.1, 2.2 und ein gemischter Typ (pooled). Diese Glykoproteine tragen  $\alpha$ 2,6-sialysierte Strukturen [Müthing et al. 2005]. Bindungsstudien mit diesen Haptoglobinen zeigen eine starke Affinität für rML [Frantz et al. 2000, Müthing et al. 2004 und 2005].

Aufgrund dieser  $\alpha$ 2,6-Sialinsäure-Spezifität werden Untersuchungen mit humanem Haptoglobin durchgeführt, die Asialofetuin als Matrix ersetzen sollen, um die Testsensitivität des ELLA für rML zu verbessern. Um genaue Informationen über die Kohlenhydrat-Bindungsspezifität

von rML an den verschiedenen Glykoproteinen geben zu können, wird der ELLA zusätzlich in Gegenwart des konkurrierenden Kohlenhydrats  $\beta$ -D-Lactose durchgeführt.

### 3.2.10.1 Bestimmung der Bindungsspezifität von rML

Um Informationen über die Bindungsspezifität von rML zu erhalten, wird ein ELLA durchgeführt, bei dem mit verschiedenen Glykoproteinen beschichtete Mikrotiterplatten eingesetzt werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3-5 dargestellt [Hussein und Daniels 2007].

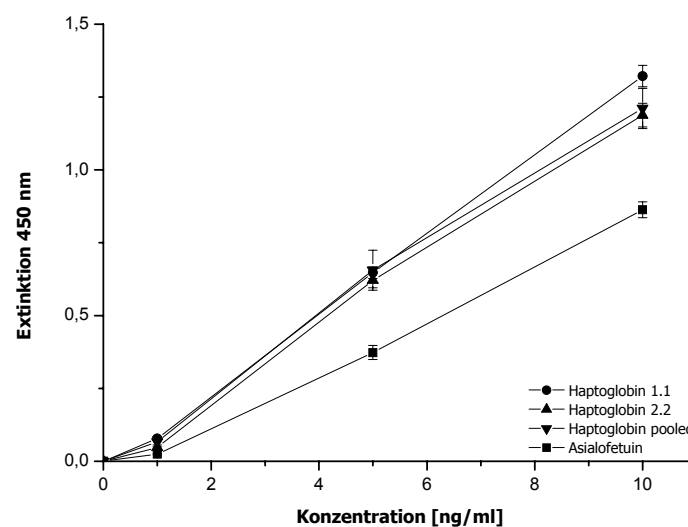


Abbildung 3-5: Mikrotiterplatten-Adsorptions-Assay von rML I mit verschiedenen Glykoproteinen. Die Fähigkeit von Asialofetuin (■), Haptoglobin Phänotyp 1.1 (●), Haptoglobin Phänotyp 2.2 (▲) und Haptoglobin pooled (▼) an rML I zu binden wird untersucht.

Die Kurven, die aus diesen Untersuchungen resultieren, zeigen starke Bindungsinteraktionen des rML gegenüber allen getesteten Glykoproteinen. Nur mit Asialofetuin beschichtete Mikrotiterplatten führen zu einer offensichtlich schwächeren Bindung von rML. Humanes Haptoglobin Phänotyp 1.1, 2.2 und pooled zeigen fast vergleichbare Bindungsprofile bei dieser Testanordnung. Bei Adsorptionsversuchen von humanen Glykoproteinen mit rML in Mikrotiterplatten zeigt humanes Haptoglobin ebenfalls stark positive Reaktionen [Müthing et al. 2005]. Dieses Verhalten wird vorwiegend bei Glykoproteinen beobachtet, die  $\alpha$ 2,6-sialysierte Strukturen tragen, wie z.B. das humane Haptoglobin [Müthing et al. 2002]. Asialofetuin, ein desialysiertes Fetuin, das ebenfalls positive Reaktionen mit Mistellektin I eingeht, zeigt eine nur geringe Bindung.

Um genaue Aussagen über die untersuchten Glykoproteine zu machen, wird eine Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze durchgeführt. Tabelle 3-2 zeigt die ermittelten Ergebnisse für diesen Bindungsassay.

Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass mit dem humanen Haptoglobin Phänotyp 1.1 als Bindungspartner, die niedrigste Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze (1 ng/ml) erzielt werden kann. Dieses Glykoprotein ist deutlich sensibler als das bisher üblicherweise verwendete Asialofetuin (Nachweis- und Bestimmungsgrenze jeweils 5 ng/ml). Humanes Haptoglobin Phänotyp 2.2 zeigt die gleichen Werte wie Asialofetuin. Nur für Haptoglobin pooled wird eine Bestimmungsgrenze über 10 ng/ml und eine Nachweisgrenze über 5 ng/ml ermittelt. Die untersuchten Haptoglobine sind deutlich weniger gut geeignet als das sonst eingesetzte Asialofetuin.

Tabelle 3-2: Nachweis- und Bestimmungsgrenze für rML (n=8).

<b>Substanz</b>	<b>Nachweisgrenze [ng/ml]</b>	<b>Bestimmungsgrenze [ng/ml]</b>
Asialofetuin	5	5
Humanes Haptoglobin pooled	5	10
Humanes Haptoglobin Phänotyp 1.1	1	1
Humanes Haptoglobin Phänotyp 2.2	5	5

### 3.2.10.2 Hemmtest und Testselektivität

Der Hemmtest wird eingesetzt, um die Bindungsaffinität von rML an verschiedenen Glykoproteinen in Gegenwart eines inhibierenden Kohlenhydrates,  $\beta$ -D-Lactose, zu bewerten. Mehrere Studien zeigen, dass natürliches Mistellektin I zusätzlich zu seiner Affinität für  $\alpha$ 2,6-Sialylsäure-Strukturen eine erkennbare Neigung für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Galaktose (Gal $\alpha$  und Gal $\beta$ ) verknüpfte Einheiten besitzt [Müthing et al. 2002, Lee et al. 1994, Gupta et al. 1996]. Aus diesem Grund wird  $\beta$ -D-Lactose ausgewählt, um mit der für Kohlenhydrate spezifischen Bindung der rML-B-Kette zu konkurrieren [Eck et al. 1999 b]. Die Ergebnisse dieser Studie werden in Abbildung 3-6 präsentiert [Hussein und Daniels 2007].

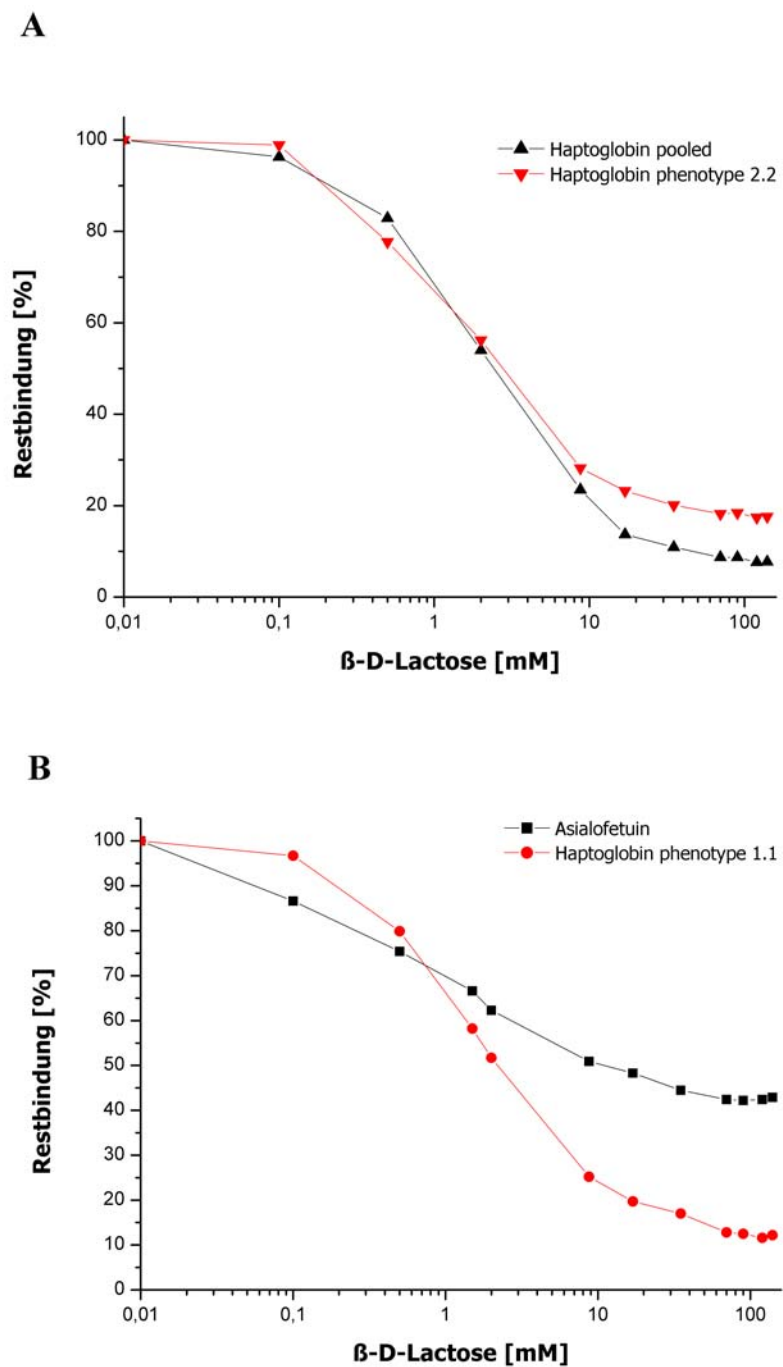


Abbildung 3-6: Bestimmung der Kohlenhydrat-Bindungsspezifität von rML I mit verschiedenen Glykoproteinen mittels ELLA. Die Bindung von rML I an unterschiedlichen Matrices ist gegen die spezifische  $\beta$ -D-Lactose-Konzentration aufgetragen (n=8).



Die Resultate der  $IC_{50}$ -Werte für alle getesteten Glykoproteine sind in Tabelle 3-3 dargestellt. Dabei stellt der  $IC_{50}$ -Wert die Konzentration des Inhibitors dar, der eine Bindungsreduktion des rML von 50 % bewirkt.

Tabelle 3-3: Mit  $\beta$ -D-Lactose ermittelte  $IC_{50}$ -Werte verschiedener Glykoproteine.

Glykoprotein	$IC_{50}$ [mM]
Asialofetuin	11.78
Haptoglobin Phänotyp 1.1	2.14
Haptoglobin Phänotyp 2.2	2.42
Haptoglobin pooled	2.31

Ein Vergleich der vier Bindungspartner zeigt signifikante Unterschiede der  $IC_{50}$ -Daten. Die Menge an  $\beta$ -D-Lactose, die benötigt wird, um 50 % der rML-Bindung an Asialofetuin zu reduzieren, beträgt 11,78 mM. Humanes Haptoglobin Phänotyp 1.1, 2.2 und pooled ergeben ähnlich niedrige Intensitäten für eine 50 %-ige Bindungsreduktion von ca. 2 mM. Die Spezifität von Asialofetuin für rML ist somit fast sechs Mal höher als für die untersuchten Haptoglobine. Dieser Hemmtest mit  $\beta$ -D-Lactose als konkurrierendem Kohlenhydrat lässt darauf schließen, dass Asialofetuin als Matrix für den verwendeten ELLA spezifischer ist als die verwendeten Haptoglobine. Diese Aussage kann zumindest auf den untersuchten Konzentrationsbereich gemacht werden. Asialofetuin scheint eine höhere Bindungsfähigkeit gegenüber rML zu besitzen als die übrigen verwendeten Glykoproteine.

Die sigmoidalen Hemmkurven, die in Abbildung 3-6 gezeigt werden, pendeln sich bei der höchsten eingesetzten Inhibitorkonzentration bei ungefähr 10-18 % ein. Nur die Asialofetuinmatrix stabilisiert sich bei höheren Konzentrationen (40 %). Es ist deutlich zu erkennen, dass das inhibierende Kohlenhydrat  $\beta$ -D-Lactose nicht in der Lage ist, die gesamte an der Matrix gebundene rML I-Menge zu verdrängen.

### 3.2.10.3 Zusammenfassung Hemmtest und Testselektivität

Bei Betrachtung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ist Haptoglobin Phänotyp 1.1 gegenüber den anderen Glykoproteinen deutlich vorteilhafter. Dieses humane Protein erscheint qualifizierter zu sein als Asialofetuin, dass bisher häufig als Bindungspartner eingesetzt wurde.

Jedoch zeigt die Kohlenhydratbindung von rML I eine höhere Spezifität für Asialofetuin als für die getesteten humanen Haptoglobine. Geringe  $\beta$ -D-Lactose-Konzentrationen sind bei Haptoglobinen ausreichend, um eine Bindungsreduktion von 50 % zu erzielen.

Die Ergebnisse, die hier präsentiert werden, lassen darauf schließen, dass es möglich ist, den ELLA für die Quantifizierung von rML I auszuwählen. Der Fokus kann entweder auf die Spezifität oder die Sensitivität gelegt werden, indem die geeignete Beschichtungsmatrix für die Mikrotiterplatte gewählt wird. Bei Einsatz von Asialofetuin kann eine erhöhte Spezifität, bei Haptoglobin Phänotyp 1.1 als Matrix eine verbesserte Sensitivität erzielt werden.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wird weiterhin Asialofetuin als Matrix eingesetzt, da für die rML-Bestimmungen eine hohe Spezifität nötig ist.

### 3.2.11 pH-Wert-Bestimmung

Der pH-Wert der Probenlösungen und der verwendeten Pufferlösungen wird mit einem pH-Meter (WTW, D-Weilheim) ermittelt. Die Kalibrierung der Glaselektrode erfolgt mit Standardpufferlösungen pH 4,66 und 9,00 (Merck, D-Darmstadt). Die untersuchten Puffer weichen um  $\pm 0,02$  pH-Einheiten vom geforderten Sollwert ab.

### 3.2.12 Berechnung der Ionenstärke

Die Berechnung der Ionenstärke erfolgt mit folgender Gleichung (Gleichung 3-1):

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2 \quad \text{Gleichung 3-1}$$

$C_i$  ist die Konzentration jedes Ions in mol/l und  $z_i$  seine Valenz. Die Ionenstärke ist abhängig von der gesamten Menge der Ionenladungen und nicht von den spezifischen Eigenschaften der Salze in Lösung [Martin 2002]. Bei einfach geladenen Ionen, wie in diesem Fall NaCl, ist die Ionenstärke gleich der Salzkonzentration in mol/l. Die für bestimmte Versuche eingesetzten NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration sind in der folgenden Tabelle 3-4 mit den berechneten Ionenstärken aufgeführt.

Tabelle 3-4: Ionenstärken verschiedener Kochsalzlösungen.

Kochsalzlösung [%]	Ionenstärke [mol/l]
1,2	0,205
0,9	0,154
0,45	0,0769
0,1125	0,0192

### 3.2.13 Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) –Spektroskopie

Mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie können die Proteinkonformation und -konzentration biologischer Makromoleküle bestimmt werden [Surewicz et al. 1993, Pistorius 1995]. Dabei wird die Probe simultan mit allen Wellenlängen bestrahlt und die Absorption gleichzeitig in einem großen Wellenlängenbereich aufgenommen. Dazu werden die verschiedenen Wellenzüge des Strahls in einem Interferometer zur Interferenz gebracht und die entstehenden Interferogramme registriert. Nach Fouriertransformation des Signals liefert das Interferogramm ein Transmissions- oder Absorptionsspektrum. Ein eingebauter Laser erlaubt eine Gerätejustierung und so Messungen mit einer sehr hohen Wellenzahlgenauigkeit. Vorteile gegenüber der klassischen IR-Spektroskopie sind eine höhere Geschwindigkeit, Empfindlichkeit und Genauigkeit, mit der IR-Spektren gemessen werden können [Holtzhauer 1996].

Mit Hilfe geeigneter Messzellen (AquaSpec™ Durchfluss-Transmissionszelle der Firma Bruker Optics, D-Ettlingen) kann die Stabilität von Proteinen, eine Quantifizierung von Sekundärstrukturänderungen und eine Sekundärstruktur- und Konzentrationsbestimmung erfolgen.

Alle FTIR-Messungen sind freundlicherweise von der Firma Bruker Optics (D-Ettlingen) durchgeführt worden.

#### 3.2.13.1 Probenvorbereitung

Zur Konformationsbestimmung von Proteinen mittels FTIR ist eine Proteinkonzentration von mindestens 0,5 mg/ml nötig. Alle eingesetzten Proteinlösungen müssen daher aufkonzentriert werden. Dazu werden Vivaspin 500 Filter der Firma Sartorius (D-Hannover) mit einer maximalen Porengröße von 3000 Da verwendet. Die Filtereinheiten werden vor Gebrauch drei Mal durch Zentrifugieren mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Verwendet wird die Zentrifuge Allegra™ 64R Centrifuge (Beckman Coulter GmbH, D-Unterschleißheim). Die Filter werden 25 Minuten bei 14000 Umdrehungen pro Minute (RPM) bei Raumtemperatur zentri-

fugiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation des Filters mit 5 % Tween 20 (Brenntag, D-Mühlheim a.R.) in bidestilliertem Wasser über Nacht, um freie Bindungsstellen abzusättigen und so eine Adsorption des zu bestimmenden Lysozyms zu vermeiden. Das blockierende Reagenz wird ausgewaschen, der Filter mit Wasser gespült und nochmals mit Wasser wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Waschwasser wird nicht verworfen, sondern ebenfalls IR-spektroskopisch vermessen, um gegebenenfalls auftretende Banden des Blockungsmittels vom Probenspektrum zu subtrahieren. Anschließend wird die zu bestimmende Probenlösung auf die Filtereinheit gegeben und 20 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wird ebenfalls IR-spektroskopisch vermessen, um Puffersubstanzen, die neben dem Protein in der Probenlösung vorkommen, kompensieren zu können.

### *3.2.13.2 Messung*

Die Messungen erfolgen mit dem Confocheck™ (Bruker Optics, D-Ettlingen) in einer AquaSpec Transmissionszelle. Für jede Probenmessung wird ein Probenvolumen von 30 µl benötigt. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Für die Messparameter wird eine Auflösung von 4 cm<sup>-1</sup> bei einer Messzeit von 100 Sekunden pro Probe festgelegt. Die Messtemperatur beträgt 25 °C.

Nach der Messung des verwendeten Puffers als Referenz erfolgt die Befüllung der Messzelle mit 30 µl Probenlösung und anschließend die Vermessung der Proben. Anschließend wird die Messzelle zwei Mal mit 50 µl Puffer gespült und der beschriebene Messablauf erfolgt erneut wie bereits beschrieben.

Bestimmt werden die Konformation von Lysozym in NaCl 0,45 % nach Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln.

### *3.2.13.3 Auswertung*

Für die Auswertung der gemessenen Spektren erfolgt eine Zuordnung der Schwingungen. Dabei werden vor allem die Amid-I und -II-Banden verwendet und seltener auch die Amid-III-Bande. Ein Beispielspektrum von BSA in wässriger Lösung ist in Abbildung 3-7 (von Bruker Optics) dargestellt.

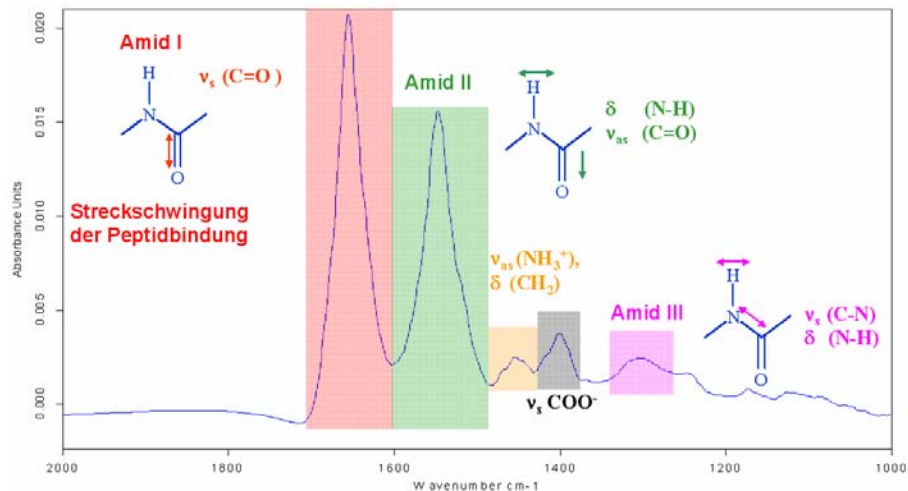


Abbildung 3-7 :Zuordnung der drei Amid-Banden in einem FTIR-Spektrum von BSA in wässriger Lösung [von Bruker Optics].

Das Verhältnis dieser drei Sekundärstrukturelemente kann mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie ermittelt werden. Bei der Bestimmung der Proteinkonformation mittels FTIR bei den vorliegenden Proben wird die C=O-Streckschwingung der Peptidbindungen der Amid I-Bande herangezogen, die besonders empfindlich für Konformationsänderungen ist. Die Wellenlängenmaxima für die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt und random coil-Strukturen (ungeordnet) sind in Abbildung 3-8 dargestellt.

Die  $\alpha$ -Helix besitzt ihr Maximum bei einer Wellenzahl von  $1652\text{ cm}^{-1}$ , die ungeordnete random-coil-Struktur bei  $1645\text{ cm}^{-1}$ . Die C=O-Streckschwingung der Peptidbindungen der Amid I-Bande für das  $\beta$ -Faltblatt dagegen zeigt bei  $1680$  und  $1630\text{ cm}^{-1}$  zwei Maxima.

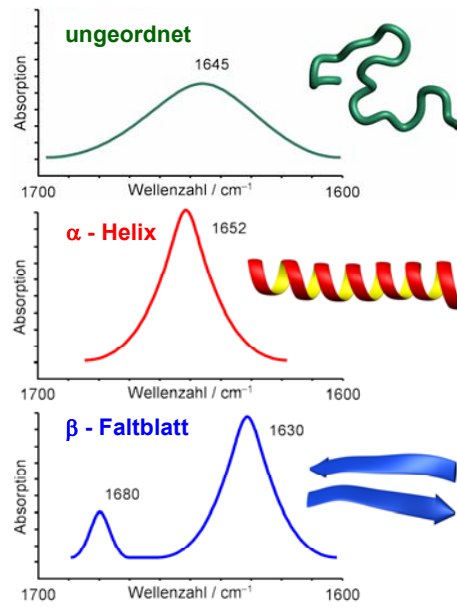


Abbildung 3-8: Schematische Darstellung der Amid I-Bande für  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und random coil-Strukturen (ungeordnet) [von Bruker Optics].

## 4 Versuchsergebnisse und Diskussion

Die Charakterisierung des Adsorptionsverhaltens von Lysozym als Modellprotein nach Wechselwirkung mit unterschiedlichen Primärpackmitteln erfolgt hinsichtlich des Proteingehaltes, der Konformation und der katalytischen Aktivität.

### 4.1 Einfluss von Primärpackmitteln

Die verwendeten Behältnisse sind aus Typ I-Glas, Type I plus<sup>®</sup> und Topas<sup>®</sup> mit und ohne zusätzlicher Silikonisierung gefertigt. Um ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu erhalten, werden 10 ml Injektionsfläschchen verwendet, die nur zur Hälfte befüllt und unter Bewegung gelagert werden, um die Proteinlösung optimal mit der Oberfläche des PPM in Kontakt kommen zu lassen. Als Modellprotein wird Lysozym in einer Konzentration von 0,1 mg/ml verwendet

#### 4.1.1 Wasser

##### 4.1.1.1 Bestimmung der Adsorption

Zur Beurteilung eines Wirkstoffverlustes in Lösung durch Proteinadsorption erfolgt eine Konzentrationsbestimmung des Proteins nach Bradford (1976). Bestimmt wird die (Rest)-Konzentration in Lösung. Aus der Differenz zur eingesetzten Proteinkonzentration ergibt sich die adsorbierte Lysozymmenge.

Lysozym wird aus rein wässriger Lösung an keines der untersuchten PPM in messbarer Menge adsorbiert, wie aus dem gleich bleibenden Lysozymgehalt während der Lagerung ersichtlich wird (siehe Abbildung 4-1).

##### 4.1.1.2 Bestimmung der Konformation

Abbildung 4-2 gibt den Helixanteil von Lysozym in den fünf untersuchten PPM wieder. Es wird deutlich, dass sich fast keine Unterschiede in der Sekundärstruktur des Proteins zeigen. In allen fünf Gefäßtypen nimmt der helikale Anteil an der Lysozymstruktur nicht ab. Lediglich in unsilikonisiertem Topas<sup>®</sup> zeigen sich nach 14 Tagen leicht höhere Helixwerte.

##### 4.1.1.3 Bestimmung der Aktivität

In Abbildung 4-3 ist die spezifische Aktivität von Lysozym in Wasser dargestellt. Bei der Lagerung des Proteins in rein wässriger Lösung ist kein Einfluss des PPM auf die Proteinaktivität zu bestimmen. Bei allen Behältnismaterialien zeigen sich über die Lagerungsdauer hinweg vergleichbare Werte.

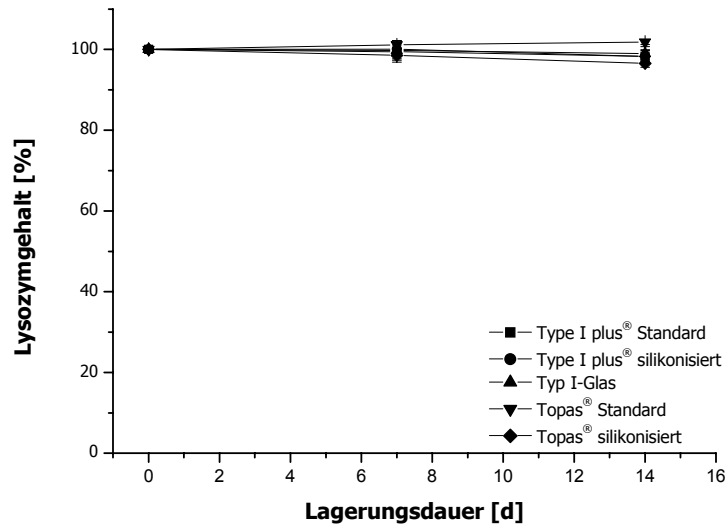


Abbildung 4-1: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in rein wässriger Lösung bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6).

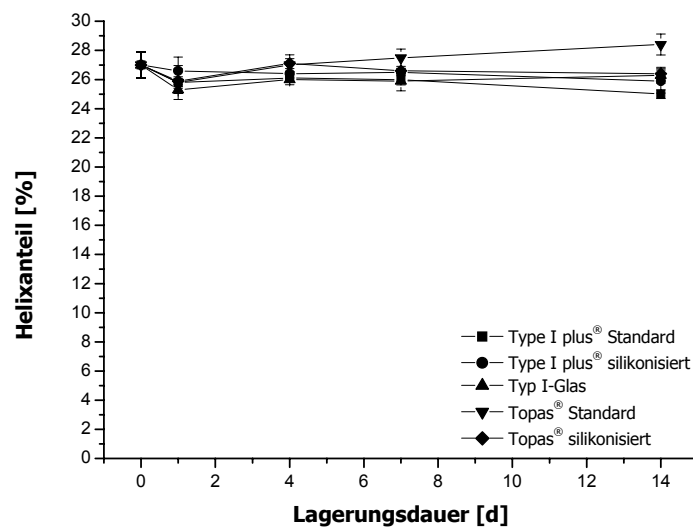


Abbildung 4-2: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in rein wässriger Lösung bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6).



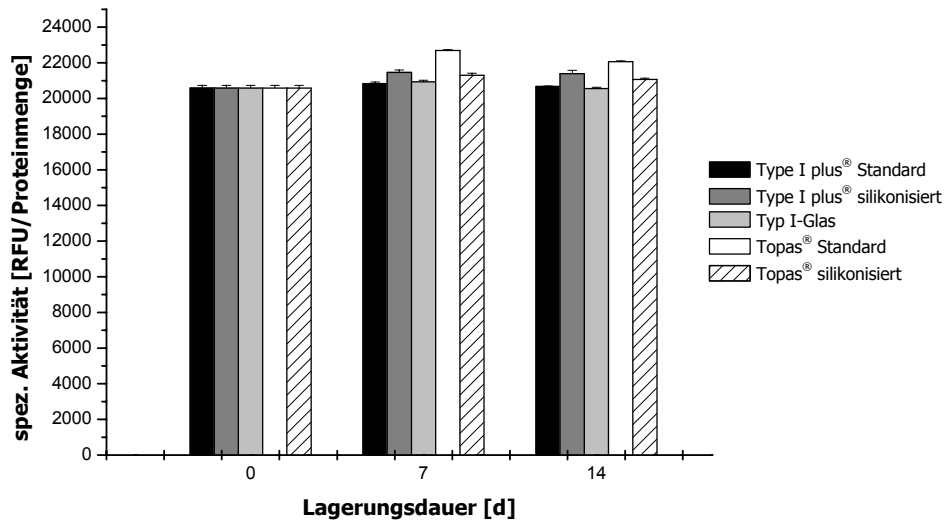


Abbildung 4-3: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in rein wässriger Lösung bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6).

#### 4.1.2 Ionenstärke

Die Ionenstärke kann die Konformation und die Wechselwirkungen mit PPM verändern. Um weitere Aussagen bezüglich der Eignung der untersuchten Behältnisse machen zu können, werden Lysozymlösungen mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen eingesetzt. Dabei wird der Einfluss von NaCl im hypertonen (1,2 %), physiologischen (0,9 %) und hypotonen (0,45 %) Konzentrationsbereich miteinander verglichen.

##### 4.1.2.1 Bestimmung der Adsorption

Der Einfluss unterschiedlicher Kochsalz-Konzentrationen auf die Adsorption von Lysozym in Lösung ist in Abbildung 4-4 zusammengefasst.

Die ermittelte Proteinkonzentration in Lösung ist weitestgehend unabhängig von der Salzkonzentration und dem eingesetzten PPM. Es kann kein Unterschied zwischen den Oberflächen erfasst werden.

Eine Ausnahme bildet lediglich die Lagerung von Lysozym in 1,2 %iger NaCl-Lösung unter Verwendung von Typ I-Glas. Hier kann nach 14 Tagen Lagerung ein Verlust von ca. 8 % Lysozym gemessen werden.

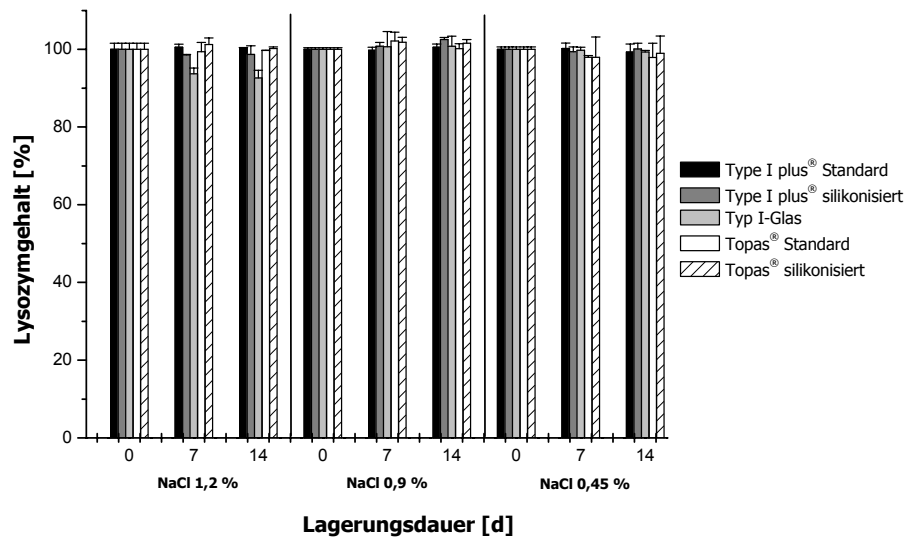


Abbildung 4-4: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in unterschiedlich konzentrierten wässrigen NaCl-Lösungen bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6).

#### 4.1.2.2 Bestimmung der Konformation

Abbildung 4-5 zeigt die Ergebnisse bei der Lagerung des Enzyms in hypertonischer NaCl-Lösung (1,2 %).

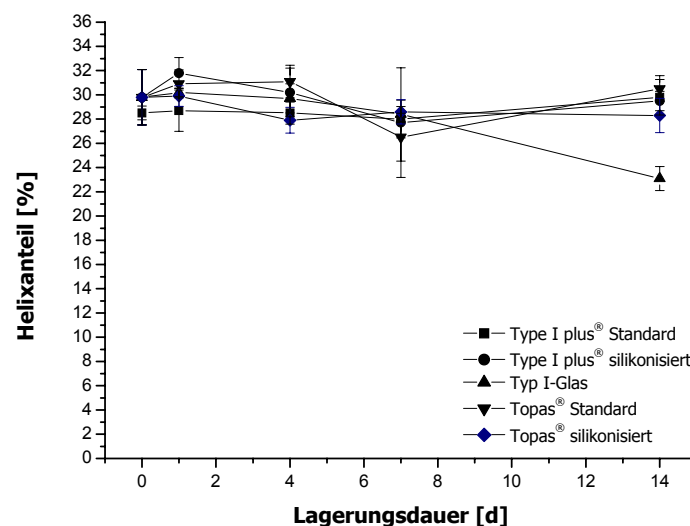


Abbildung 4-5: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in 1,2 %-iger NaCl-Lösung bei Lagerung in verschiedenen PPM (n=6).

Es ist zu erkennen, dass Type I plus® und Topas®, sowohl in silikonisierter als auch in nicht silikonisierter Form, keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Lysozyms haben. Allerdings ergibt sich für das Typ I-Glas (hohe hydrolytische Resistenz) ein anderes Bild. Hier sinkt der Helixanteil nach 14tägiger Lagerungsdauer von ursprünglich knapp 30 % auf 23 %.

Das Ergebnis für die Lagerung von Lysozym in physiologischer (0,9 %) und hypotoner (0,45 %) Kochsalzlösung ist exemplarisch für beide Lösungen in Abbildung 4-6 für NaCl 0,45 % dargestellt. In dieser Grafik ist der prozentuale Helixanteil gegen die Lagerungszeit für Lysozym in 0,45 % NaCl aufgetragen.

Das angeführte Beispiel zeigt deutlich, dass der Anteil an Helixstruktur bei jedem untersuchten Primärpackmittel gleich bleibend ist. Es ergibt sich an Tag 1 für alle Lösungen - außer Type I plus® - ein geringer Abfall des Helixanteils, der aber im Laufe der Lagerung wieder auf den Anfangswert ansteigt.

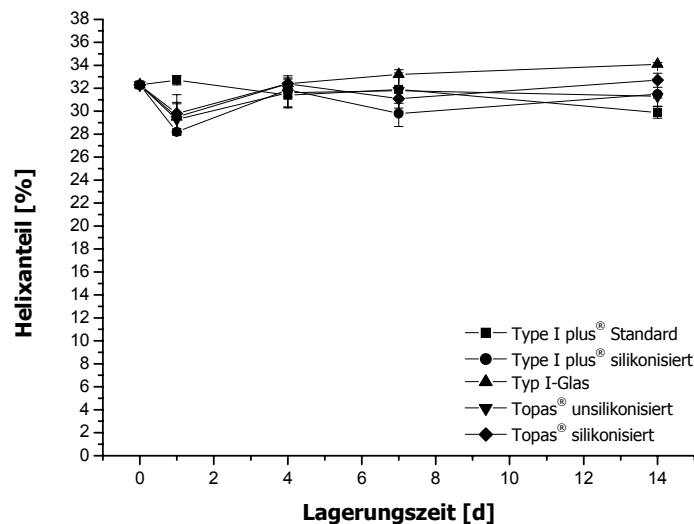


Abbildung 4-6: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger NaCl-Lösung 0,45 % bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6).

#### 4.1.2.3 Bestimmung der Aktivität

In Abbildung 4-7 ist eine Zusammenfassung der spezifischen Aktivität des Lysozyms in drei unterschiedlich konzentrierten Kochsalzlösungen dargestellt.

Ein Vergleich dieser Systeme zeigt, dass bei Lagerung von Lysozym in NaCl 0,45 % ein deutlicher Einfluss aller Primärpackmittel zu beobachten ist, da hier die spezifische Aktivität deutlich niedriger ist. Darüber hinaus zeigt Typ I-Glas im Verlauf der Lagerung ein weiteres Absinken der spezifischen Aktivität. Verglichen mit der rein wässrigen Lösung büßt das Enzym die Hälfte seiner Aktivität ein (siehe Abbildung 4-3).

Während Lysozym in NaCl 1,2 % ein leichtes Absinken der Aktivität für Type I plus®-Glas mit und ohne Silikonisierung und Typ I-Glas zeigt, ist bei Lagerung in NaCl 0,9 % eine fast konstant bleibende Funktion des Lysozyms zu messen. Ein deutlicher Effekt eines PPM auf die katalytische Aktivität ist hier nicht auszumachen.

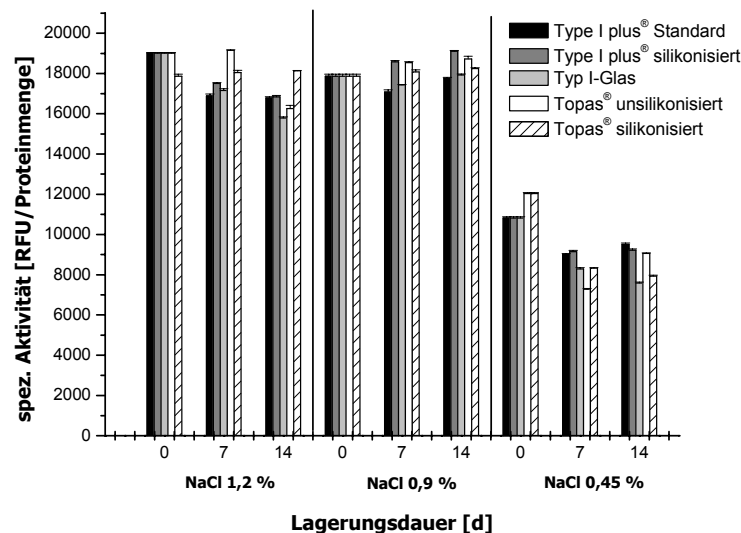


Abbildung 4-7: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässrigen NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6).

#### 4.1.2.4 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit verschiedenen Primärpackmitteln

Zahlreiche Faktoren spielen hinsichtlich der Eignung verschiedener PPM für wässrige Lösungen des Modellwirkstoffs Lysozym eine wichtige Rolle. Dabei ist ein direkter Einfluss auf die Stabilität des Proteins nur dann zu erwarten, wenn eine Adsorption an der Fest-Flüssig-Grenzfläche erfolgt. Die weiteren Konsequenzen hängen darüber hinaus davon ab, ob ein solcher Adsorptionsvorgang reversibel oder irreversibel verläuft. Irreversible Adsorption führt ausschließlich zu einer Konzentrationsabnahme. Dies kann bei niedrig konzentrierten Proteinlösungen zu einem signifikanten Wirkstoffverlust führen. Bei hohen Proteinkonzentrationen

(0,1 mg/ml Lysozym) spielt dies kaum eine Rolle, da der Konzentrationsverlust nur marginal ist. Daher ist bei der Lagerung von Lysozym in den untersuchten Behältnissen zwischen diesen hinsichtlich der Adsorptionseffekte im Rahmen der Messgenauigkeit kein Unterschied zu erkennen. Alle verwendeten Lösungen zeigen konstante Proteinkonzentrationen, die sich auch im Verlaufe der Lagerung nicht verändert haben.

Übereinstimmend damit bleibt bei der Untersuchung rein wässriger Lysozymbelösungen die Konformation und die Aktivität während der Lagerung erhalten.

Etwas andere Verhältnisse ergeben sich bei den kochsalzhaltigen Lösungen: In hypertonem Medium (NaCl 1,2 %) ist eine Konzentrationsabnahme in Gefäßen aus Typ I-Glas zu beobachten. Grundsätzlich ist dies nicht verwunderlich, da die Lysozymbelösungen einen pH-Wert von 6,5 aufweisen und das Enzym bei diesem pH-Wert eine positive Nettoladung trägt. Die Glasoberfläche ist unter diesen Bedingungen negativ geladen, so dass eine Adsorption aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen erfolgen kann. Diese sollten jedoch mit sinkendem Elektrolytgehalt stärker werden und erklären somit nicht das beobachtete Verhalten, wenn nicht gleichzeitig von einer strukturellen Veränderung des Proteins in Abhängigkeit vom Elektrolytgehalt ausgegangen wird. Dies wird gestützt durch den veränderlichen Helixanteil der Vergleichslösungen in Abhängigkeit vom Salzgehalt.

Darüber hinaus geben die Untersuchungen mit Vials aus unterschiedlichen Behältnismaterialien einen Hinweis darauf, dass die Bindung von Lysozym an Glasoberflächen kein irreversibler Prozess ist, da es in Kombination mit einer Konzentrationsabnahme und bei Einsatz einer hypotonen 0,45 %igen NaCl-Lösung auch ohne messbare Konzentrationsabnahme zu einer Veränderung des Helixanteils und /oder der Aktivität kommt. Aufgrund des ungünstigen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen sind diese Effekte nur sehr gering ausgeprägt, so dass sie nur als schwacher Hinweis für einen Destabilisierungsmechanismus unter Beteiligung von Ad- und Desorptionsvorgängen zu werten sind.

## 4.2 Oberflächenmaterialien

Bei der Lagerung von Lysozym in den unterschiedlichen PPM-Behältnissen sind keine bemerkenswerten Unterschiede hinsichtlich dessen Lagerstabilität festzustellen. Um den Effekt der Wechselwirkung mit dem PPM besser bestimmen zu können, wird im Folgenden das Oberflächen-Volumen-Verhältnis stark vergrößert, indem die zu untersuchenden PPM-Materialien mit definierter Oberfläche in den Proteinlösungen dispergiert werden. Als Oberflächenmaterialien werden Glasperlen und Topas<sup>®</sup>-Granulat, ein zyklisches Olefin-Copolymer, miteinander verglichen. Die Lagerung erfolgt anschließend in kleinen Polypropylengefäßen.

### 4.2.1 Wässrige Lysozymlösungen

#### 4.2.1.1 Rein wässrige Lösung

Zunächst wird das Verhalten einer rein wässrigen Lysozymlösung in Gegenwart der dispergierten Behältnismaterialien untersucht. Dabei wird diese Lösung als Standardlösung für alle übrigen untersuchten Lösungen betrachtet.

In Gegenwart von Topas<sup>®</sup> ändert sich die Proteinkonzentration während der 14-tägigen Lagerung nicht. In Gegenwart von Glas allerdings wird die Lysozymkonzentration nach einer Woche um ca. 5,5 % und um etwa 9 % nach 14 Tagen verringert (siehe Abbildung 4-8). Dieses entspricht einer adsorbierten Menge von ca. 2 mg/m<sup>2</sup> Glasperlen.

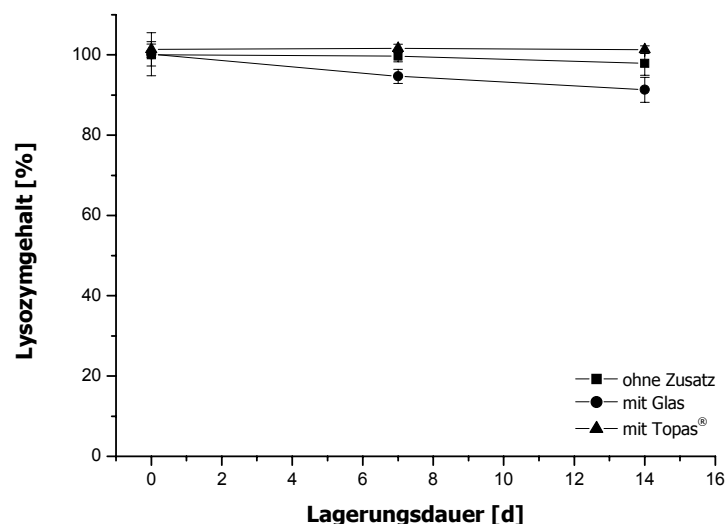


Abbildung 4-8: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in rein wässriger Lösung mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6).

Deutlich ausgeprägter stellt sich der Einfluss des PPM bei Bestimmung der Konformation dar. In Abbildung 4-9 ist deutlich zu erkennen, dass ohne Zusatz von PPM der Anteil an  $\alpha$ -Helix nahezu konstant bei ca. 28 % bleibt. Wird die wässrige Enzymlösung in Gegenwart von Glasperlen gelagert, ist eine Abnahme der helikalen Struktur erkennbar, die sich im Laufe der 14-tägigen Lagerung verstärkt.

Wird die Proteinlösung mit einem Granulat des zyklischen Olefin-Copolymer Topas<sup>®</sup> versetzt, bleibt der  $\alpha$ -Helixanteil des Lysozyms nahezu konstant, die Sekundärstruktur des Enzyms ist in wässriger Lösung fast unverändert geblieben.

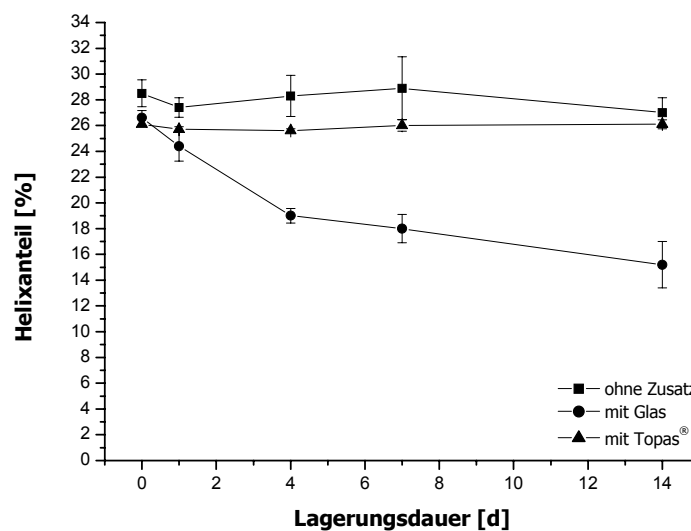


Abbildung 4-9: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in rein wässriger Lösung und mit Topas<sup>®</sup>- und Glaszusatz (n=6).

Die Ergebnisse der Konformationsbestimmung spiegeln sich in der Proteinaktivität wider (siehe Abbildung 4-10).

Es ist deutlich erkennbar, dass die Aktivität von Lysozym bei Glaskontakt gegenüber der Standardlösung um 75 % abnimmt, was auf deutliche Wechselwirkungen des Proteins mit dem Glas schließen lässt. Die Vergleichslösung und das System mit Zusatz von Topas<sup>®</sup> zeigen kaum eine Aktivitätsabnahme während der Lagerung. Allerdings zeigt die Vergleichslösung stets eine höhere Aktivität.

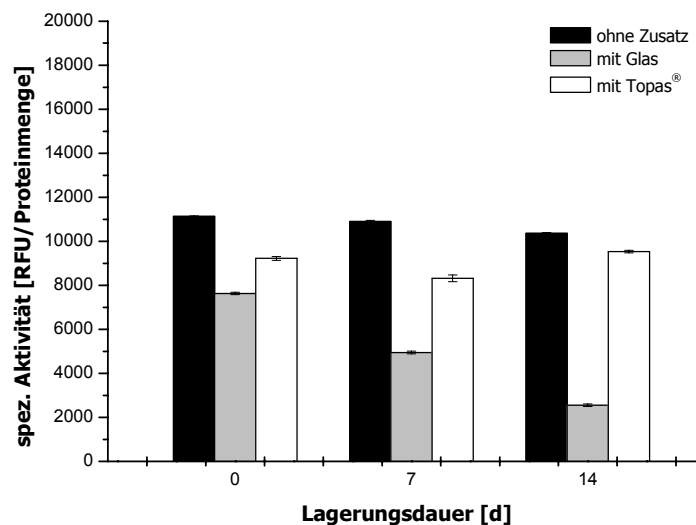


Abbildung 4-10: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in rein wässriger Lösung und mit Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

#### 4.2.1.2 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse mit Wasser als Lösungsmittel

Die wässrige Lysozym-Vergleichslösung bleibt im Untersuchungszeitraum erwartungsgemäß unverändert.

Lysozym adsorbiert an die Oberfläche der zugesetzten Glasperlen nur in geringem Umfang (ca. 2 mg/m<sup>2</sup>). Ergänzende Untersuchungen zeigen jedoch, dass dieser Effekt auch mit einer starken Veränderung der Konformation (siehe Abbildung 4-9) und einem ausgeprägten Aktivitätsverlust (siehe Abbildung 4-10) einhergeht.

Zur besseren Veranschaulichung der prozentualen Veränderung des  $\alpha$ -Helixanteils sind in Abbildung 4-11 die Differenzen der Helixanteile für Glas und Topas® gegen die Lagerungsdauer aufgetragen. Die Werte ergeben sich hierbei aus der Differenz der Mittelwerte von dem Helixanteil mit und ohne Zusatz (rein wässrige Lysozym-Standardlösung) des Primärpackmittels. Dabei stellt die Differenz der Helixanteile das Maß für die Veränderung des Proteins während der Lagerung dar.

In Abbildung 4-11 ist deutlich zu erkennen, dass nach einer Lagerdauer von 14 Tagen mit Glaszusatz eine Abnahme der Helixstruktur des Lysozyms um fast 12 % erfolgt. Bezogen auf die native Form mit einem helikalen Anteil von ca. 28 % ergibt sich eine Reduktion des Helixanteils um mehr als 40 %. Die Aktivität des Proteins nimmt dabei gegenüber der Standardlösung um fast 75 % ab.



Die geringfügige Adsorption kann weder den gravierenden Einfluss auf die Konformation noch die Abnahme der Aktivität erklären. Vielmehr geben diese Ergebnisse einen Hinweis auf eine reversible Adsorption des Lysozyms an die Glasoberfläche aus rein wässriger Lösung: Nach oder bei der Adsorption an die Glasoberfläche erfolgt eine Denaturierung mit anschließender Desorption des Proteins im Laufe der Lagerung. Hierdurch verändert sich der Helixanteil des Proteins in der wässrigen Lösungen und die spezifische Aktivität sinkt, da die Funktionalität des Enzyms dann nicht mehr gegeben ist. Nicht die Bindung des Lysozyms an die PPM-Oberfläche ist somit problematisch, sondern dessen Wiederablösung.

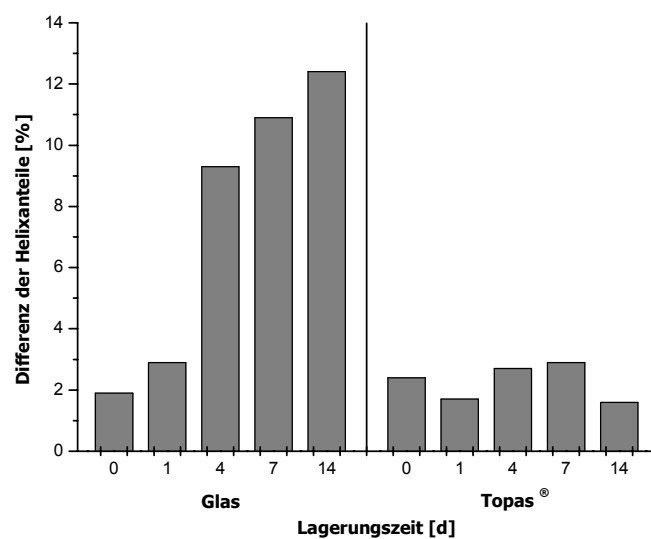


Abbildung 4-11: Differenz der Helixanteile von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger Lösung mit Topas®- und Glaszusatz (n=6). Die Differenz ergibt sich aus der Differenz zwischen den Mittelwerten der Helixanteile mit und ohne Zusatz.

Im Gegensatz zu Glas verursacht das Oberflächenmaterial Topas® diese Reaktionen praktisch nicht. Die Proteinkonzentration bleibt annähernd konstant. Der helikale Anteil zeigt nur relativ geringe Sekundärstrukturveränderungen des Proteins von ca. 2-3 % über einen Zeitraum von 14 Tagen (siehe Abbildung 4-11). Die Aktivität der Enzymlösung bleibt in Gegenwart von Topas® konstant. Allerdings ist sie niedriger als bei der Vergleichslösung ohne Zusatz eines PPM-Materials. Die Adsorption an Topas® ist demnach irreversibel oder zumindest nicht mit einer Konformationsänderung verbunden.

#### 4.2.1.3 Einfluss des pH-Wertes

Da der pH-Wert einen Einfluss auf die globuläre Struktur eines Proteins haben kann, wird in diesem Abschnitt das Verhalten des Lysozyms in verschiedenen Pufferlösungen untersucht. Lysozym besitzt bei einem pH-Wert von 5,5 sein Aktivitätsoptimum. Der IEP liegt bei pH 11,2 [Brenda Datenbank 2006]. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Sekundärstruktur von Lysozym zu untersuchen, wird das Protein bei unterschiedlichen pH-Werten in Phosphatpuffer gelagert. Die gewählten pH-Werte liegen eine pH-Einheit ober- und unterhalb des pH-Optimums (pH 4,5 und 6,5). Zusätzlich wird das Verhalten im physiologischen Phosphatpuffer pH 7,4 untersucht. Gelagert werden die Probenlösungen auch hier wiederum mit und ohne Glas- bzw. Topas®-Zusatz, um auch hier den Einfluss des PPM beurteilen zu können.

Die Lagerung des Lysozyms bei seinem pH-Optimum pH 5,5 zeigt einen gleich bleibenden Konzentrationsverlauf. Alle drei Systeme zeigen keinen Proteinverlust, die Konzentration bleibt konstant. Der Kurvenverlauf ist in Abbildung 4-12 dargestellt.

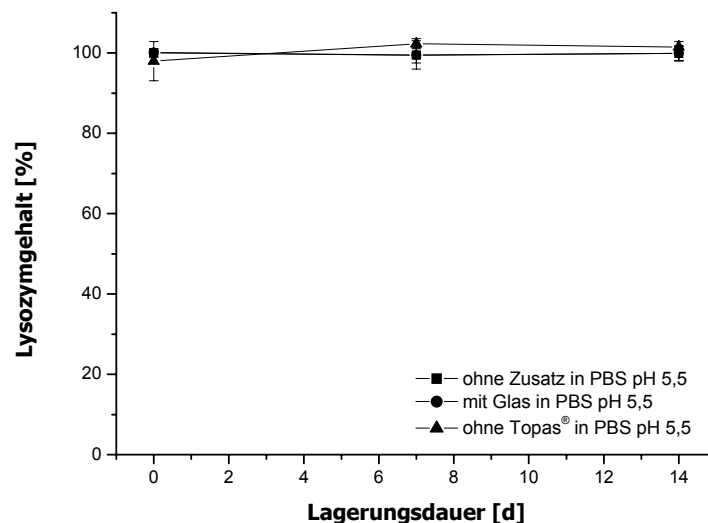


Abbildung 4-12: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in PBS pH 5,5 mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Ein deutlicher Einfluss der Glasperlen bei Bestimmung der Konformation von Lysozym in Phosphatpuffer pH 5,5 ist in Abbildung 4-13 zu erkennen. Lysozym in rein wässriger Lösung ist als Vergleichskurve mit dargestellt.

Während das System ohne Zusatz keine Änderung der Sekundärstruktur zeigt, bewirkt der Zusatz von Glasperlen eine leichte Veränderung der Proteinkonformation. Topas<sup>®</sup> als Zusatz verändert die Konformation des Enzyms nicht.

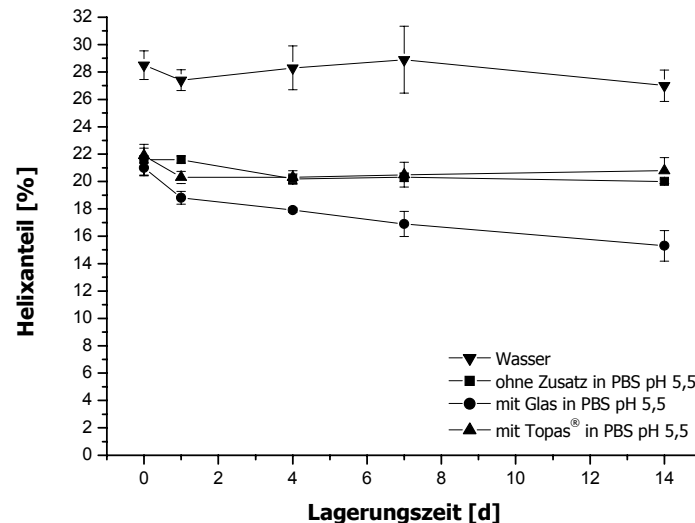


Abbildung 4-13: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 5,5 mit Topas<sup>®</sup>- und Glaszusatz (n=6). Als Vergleichskurve dient Lysozym (0,1 mg/ml) in Wasser (n=6).

Im Folgenden wird der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität des Proteins dargestellt. Die Lagerung bei einem für das Enzym optimalen pH-Wert von PBS pH 5,5 zeigt einen deutlichen Abfall der biologischen Aktivität aller untersuchten Lösungen gegenüber der rein wässrigen Lösung (siehe Abbildung 4-14). Ohne dispergiertes PPM-Material ist eine konstante Aktivität zu messen, mit Topas<sup>®</sup> ist eine konstante, aber geringfügig niedrigere spezifische Aktivität zu beobachten.

Ferner ist in Abbildung 4-14 auch erkennbar, dass der Zusatz von Glas einen kontinuierlich fortschreitenden Aktivitätsverlust bewirkt.

Erfolgt die Lagerung des Lysozyms in PBS pH 4,5 wird folgender Kurvenverlauf bei Konzentrationsbestimmung der Lysozymlösung erhalten (siehe Abbildung 4-15):

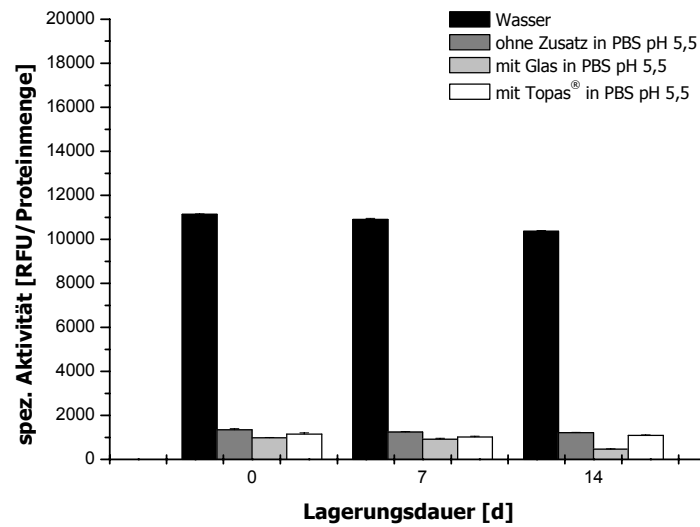


Abbildung 4-14: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in rein wässriger Lösung ohne PPM-Zusatz, in PBS pH 5,5 mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n = 6).

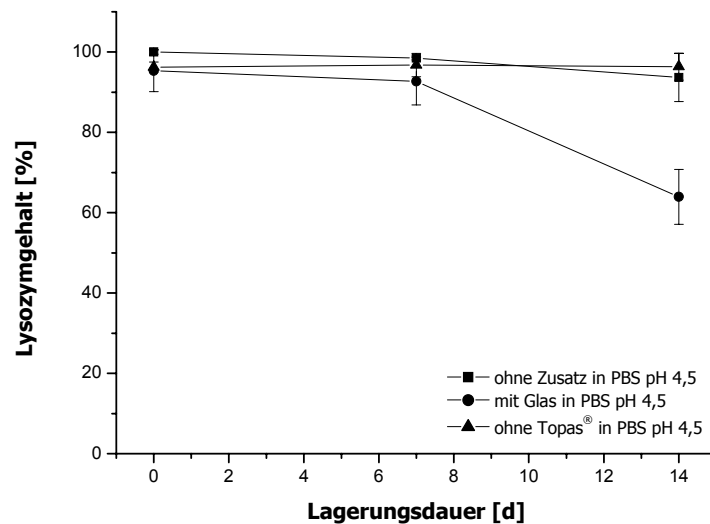


Abbildung 4-15: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in PBS pH 4,5 mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Anhand dieser Grafik ist ersichtlich, dass das Protein in der ersten Woche vollständig in der Lösung verbleibt, bei Glaszusatz allerdings in der zweiten Woche ein starker Proteinverlust zu vermessen ist. Die Abnahme der Proteinkonzentration beträgt dabei ca. 36 % nach 14 Tagen.

Abbildung 4-16 zeigt die Veränderung des Helixanteils von Lysozym bei pH 4,5. Die Grafik zeigt deutlich, dass ohne die Zugabe eines PPM der Kurvenverlauf nahezu konstant verläuft. In Gegenwart von Glas ist eine Abnahme der Sekundärstruktur von fast 6 % zu erkennen. Das Oberflächenmaterial Topas<sup>®</sup> zeigt keinerlei Einfluss. Verglichen mit der rein wässrigen Lösung ist der Gesamthelixanteil ohne Zusatz eines PPM niedriger.

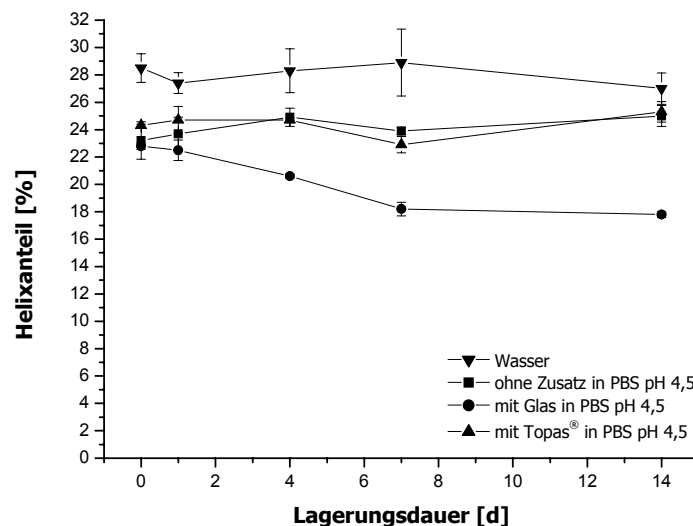


Abbildung 4-16: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 4,5 mit Topas<sup>®</sup>- und Glaszusatz (n=6). Als Vergleichskurve dient Lysozym (0,1 mg/ml) in Wasser (n=6).

In Abbildung 4-17 ist die Aktivität des Lysozyms bei pH 4,5 dargestellt. Dieses System zeigt eine ähnliche Tendenz wie die rein wässrige Lösung (siehe Abbildung 4-10). Allerdings liegt die Grundaktivität von Lysozym bei pH 4,5 (ca. 9000 RFU/100 µg/ml Protein) etwas niedriger als in der rein wässrigen Lösung (ca. 11000 RFU/100 µg/ml Protein). Glaszusatz bewirkt einen Abfall der katalytischen Aktivität der LysozymbLösung.

Die geringste Aktivität aller LysozymbLösungen wird zu Messbeginn bei pH 4,5 in Gegenwart von Topas<sup>®</sup> ermittelt. Allerdings steigt diese jedoch im Verlaufe der Lagerung wieder an.

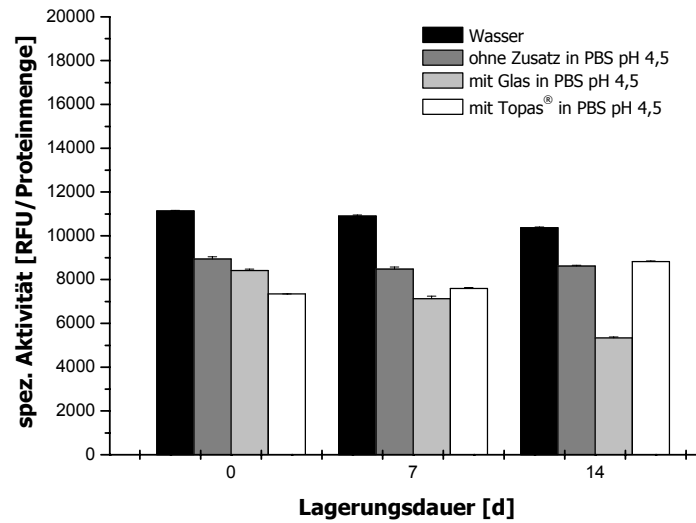


Abbildung 4-17: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in rein wässriger Lösung ohne PPM-Zusatz und in PBS pH 4,5 mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

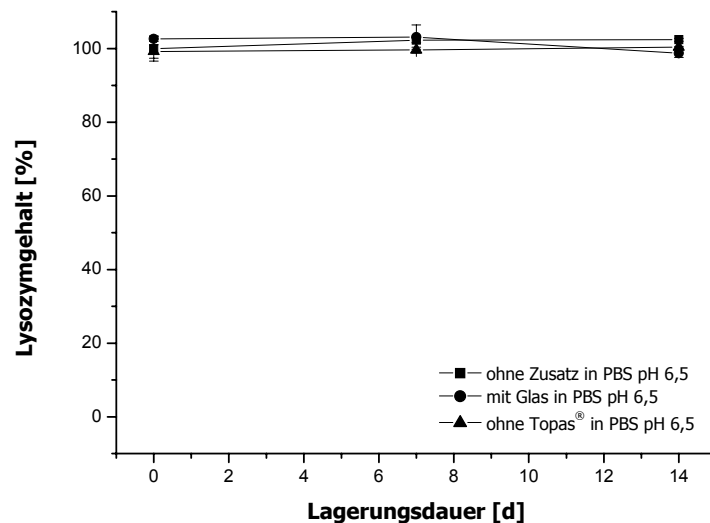


Abbildung 4-18: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in PBS pH 6,5 mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Bei Betrachtung des Kurvenverlaufes einer Lysozymlösung in PBS pH 6,5 ist deutlich erkennbar, dass sowohl bei Glas-, als auch bei Topas®-Kontakt keine Verminderung der Proteinkonzentration erfolgt (siehe Abbildung 4-18).

Die Abbildung 4-19 stellt den  $\alpha$ -Helixanteil bei pH 6,5 dar. Wie bei pH 4,5 ist hier der Gesamthelixanteil auch ohne Zusatz eines PPM im Vergleich zu einer rein wässrigen Lösung bereits erniedrigt. In Gegenwart von Glas ist ein weiterer Abfall des Helixanteils zu erkennen, der bei pH 6,5 allerdings nicht sehr stark ausgeprägt ist. Der Verlust beträgt hier nur ca. 4 %. Topas® beeinflusst die Konformation des Proteins nicht.

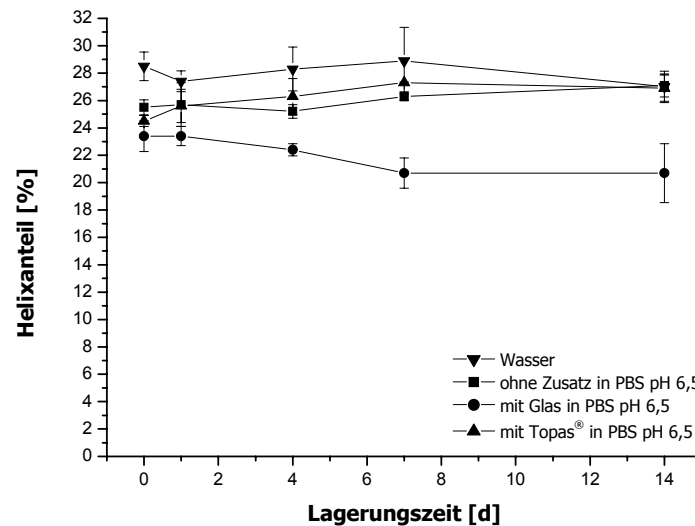


Abbildung 4-19: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 6,5 mit Topas®- und Glaszusatz (n=6). Als Vergleichskurve dient Lysozym (0,1 mg/ml) in Wasser (n=6).

Auch bei diesem pH-Wert ist ein deutlicher Aktivitätsverlust aller Systeme gegenüber der rein wässrigen Lösung zu erkennen (siehe Abbildung 4-20). Ein Glaszusatz bewirkt innerhalb der 14-tägigen Lagerung einen zusätzlichen Abfall.

Wird Lysozym in PBS pH 7,4 in Kombination mit Glas gelagert, zeigt sich nach 14 Tagen ein deutlicher Verlust an Proteinkonzentration von fast 85 % (siehe Abbildung 4-21). Die Systeme ohne PPM-Zusatz bzw. mit Topas® liefern einen konstanten Kurvenverlauf ohne Verlust an Proteinkonzentration.

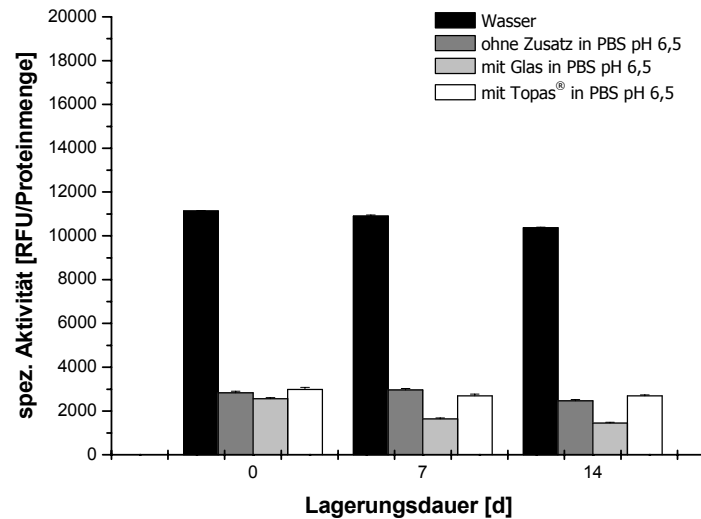


Abbildung 4-20: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in rein wässriger Lösung ohne PPM-Zusatz und in PBS pH 6,5 mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

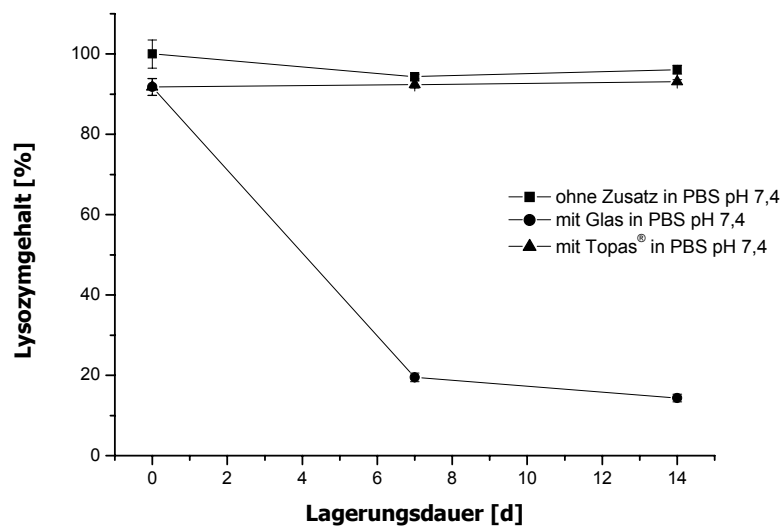


Abbildung 4-21: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in PBS pH 7,4 mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).



Die Abbildung 4-22 stellt den  $\alpha$ -Helixanteil bei pH 7,4 dar. Verglichen mit den bereits beschriebenen phosphatpufferhaltigen Systemen liegt der Gesamthelixanteil der Lysozymlösung bei pH 7,4 ohne Zusatz eines PPM höher. In Kombination mit Glasperlen zeigt sich auch bei physiologischem pH-Wert ein Konformationsverlust bei der Lagerung, während das Behältnismaterial Topas® keinerlei Einfluss zeigt.

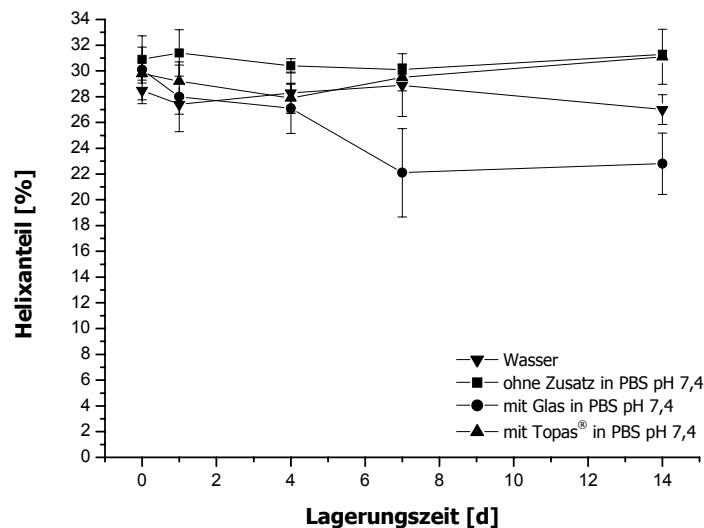


Abbildung 4-22: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 7,4 mit Topas®- und Glaszusatz (n=6). Als Vergleichskurve dient Lysozym (0,1 mg/ml) in Wasser (n=6).

In Abbildung 4-23 ist die Aktivität der Lysozymlösungen bei pH 7,4 dargestellt. Grundsätzlich ist die Anfangsaktivität aller Lösungen bei pH 7,4 gegenüber der rein wässrigen Lösung deutlich erniedrigt. Lösungen ohne PPM wie auch Systeme mit Topas® zeigen einen konstanten Wert während der Lagerung. Allerdings liegt diese bei letzteren auf einem deutlich niedrigeren Niveau als bei den Lysozymlösungen ohne Zusatz. Ein Glaszusatz bewirkt bei physiologischem pH-Wert einen nur leichten Verlust der Aktivität.

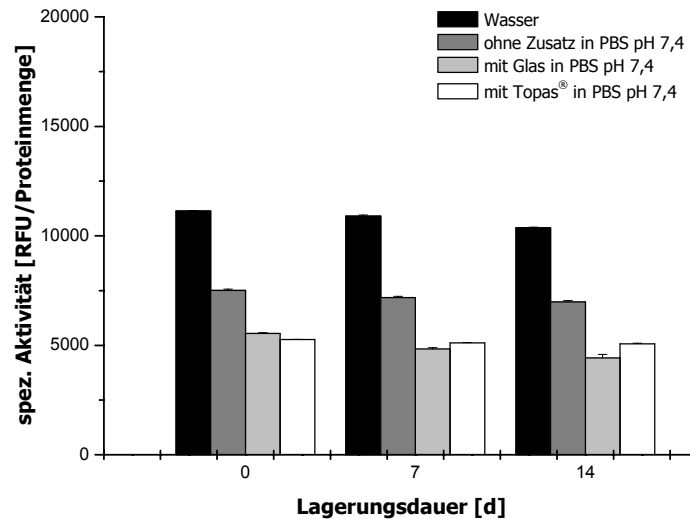


Abbildung 4-23: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in rein wässriger Lösung ohne PPM-Zusatz und in PBS pH 7,4 mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

#### 4.2.1.4 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit verschiedenen pH-Werten

Der pH-Wert des Lösungsmittels besitzt einen starken Einfluss auf das Verhalten einer Proteinlösung: Er bestimmt die Ladung der Aminosäuren (positiv oder negativ) und somit auch die Nettoladung des Moleküls und bewirkt dadurch elektrostatische Effekte. pH-Wert-induzierte elektrostatische Interaktionen können die Proteinstabilität auf zwei verschiedene Weisen beeinflussen. Bei den klassischen elektrostatischen Effekten findet eine unspezifische Abstoßung statt. Diese resultiert durch die geladenen Gruppen des Proteins bei extremen pH-Werten. Je weiter der pH-Wert der Lösung vom Isoelektrischen Punkt (IEP) des Proteins entfernt ist, desto größer ist die Abstoßung zwischen gleichen Ladungen innerhalb des Proteins. Die Konformationsstabilität wird auf diese Weise beeinträchtigt. Es kommt zu einer Entfaltung des Moleküls, die zu einer Reduktion der Ladungsdichte führt. Dieses trifft v.a. bei stark gefalteten Proteinen zu. Die pH-induzierte Entfaltung führt somit zu einem Zustand geringerer freier elektrostatischer Energie [Chi et al. 2003, Wang 1999].

Neben der unspezifischen Abstoßung können spezifische Ladungswechselwirkungen wie Salzbrücken auftreten, die die Proteinstabilität beeinflussen können. Anders als bei den zuerst genannten unspezifischen Interaktionen stabilisieren Salzbindungen Proteine bei höherer Ladung des Lösungsmittels.

Untersuchungen in unterschiedlichen Phosphatpuffern zeigen, dass die Hypothese der unspezifischen Abstoßung bestätigt werden kann. Lysozym zeigt bei der Lagerung in pH 7,4 ohne Zusatz eines PPM den höchsten Gesamthelixanteil, der sogar höher als in einer rein wässrigen Lösung (pH 6,5) liegt.

Je näher sich der pH dem IEP nähert, desto geringer ist die Abstoßung gleicher Ladungen innerhalb des Moleküls und desto weniger treten Konformationsänderungen auf.

Die niedrigsten untersuchten pH-Werte (pH 4,5 und 5,5) weisen ähnliche Gesamthelixanteile und in beiden Fällen niedrigere als in rein wässriger Lösung auf. Der pH-Wert beider Lösungen ist am weitesten vom IEP entfernt und die Ladungsdichte im Molekül somit erwartungsgemäß deutlich erhöht, was sich in einem erniedrigten Gesamthelixanteil bezogen auf die rein wässrige Lösung zeigt. Bei pH 5,5, dem eigentlichen pH-Optimum des Lysozyms, spiegelt sich dieses zusätzlich in einem starken Aktivitätsverlust wider. Allerdings liegt den Literaturdaten nicht die Verwendung eines Phosphatpuffers zugrunde, so dass ein spezifischer Effekt, der des verwendeten Phosphatpuffers pH 5,5, für diesen Unterschied verantwortlich ist [Brenda Datenbank 2006].

Alle Modellsysteme ohne PPM geben keinerlei Hinweis auf eine Veränderung des Lysozyms während der gesamten Lagerung. Allerdings ist bei pH 5,5 und 6,5 im Vergleich zu einer rein wässrigen Proteinlösung die Aktivität der Lösung stark erniedrigt.

Der pH-Wert besitzt nicht nur einen Einfluss auf das Protein, sondern ist auch für die Eigenschaften von Glas bedeutend. Das eingesetzte Glas ist hydrophil und besitzt bei den hier verwendeten pH-Werten eine negativ geladene Oberfläche, während Lysozym mit einem IEP von 11,2 eine positive Nettoladung besitzt. Aus diesem Grund spielen bei Zugabe von Glas zu der Lysozymlösung ionische Wechselwirkungen zwischen PPM und Protein eine zusätzliche wichtige Rolle.

Bei pH 7,4 und Glaszusatz ist sowohl eine Konformations- als auch Konzentrationsabnahme des Lysozyms maximal. Der Verlust an Protein durch Adsorption beträgt ca. 80 %. Hier scheinen starke Interaktionen des Wirkstoffes mit der Oberfläche zu einer Proteinadsorption zu führen. Die Oberfläche des Glases ist verglichen mit allen untersuchten PBS-Lösungen bei pH 7,4 am stärksten negativ geladen. Das Protein liegt in protonierter Form vor. Die ionischen Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche und dem Protein sind bei pH 7,4 maximal und können eine, aber nicht die alleinige Ursache für die starke Adsorption sein, da die eingesetzte Oberfläche des Glases dafür zu klein ist. Möglicherweise ist das Protein bei pH 7,4 aufgrund einer geringeren Ladungsdichte und somit geringeren Abstoßung in der Lage, sich so anzunähern, dass es sich durch eine Aggregatbildung mit anderen Molekülen bzw. Ionen weiter entfaltet [Chi et al. 2003]. Eine weitere Hypothese ist die erhöhte Dissoziation von

Calcium-Ionen aus dem Glas in die Lösung [Peters 1980]. Diese zweiwertigen Ionen können dann durch Komplex- oder Aggregatbildung mit dem Protein interagieren und so zu der starken Konzentrationserniedrigung und dem Verlust an Konformation in Lösung führen. Der Anteil an Protein, der noch intakt bleibt, verändert seine Aktivität kaum, es erfolgt eine Ab-sättigung der freien Calcium-Ionen (siehe Abbildung 4-23). Eine mögliche Ausfällung des Proteins ist aber durch eine Trübung der Lösung nicht zu erkennen gewesen.

PBS pH 5,5 und 6,5 reduzieren die Lysozymkonzentration in Lösung bei Glaskontakt nicht. Bei zusätzlicher Betrachtung der CD- und Aktivitätsdaten ist aber zu bemerken, dass diese beiden Puffer dennoch ungeeignet sind. Bei Glaskontakt sind sowohl die Aktivität als auch der Helixanteil im Vergleich zur rein wässrigen Lösung stark erniedrigt. Es erfolgt zwar eine Bestimmung des Lysozyms, allerdings scheint das Protein nach dem Oberflächenkontakt denaturiert wieder in Lösung zu gehen, wobei das Enzym an spezifischer Aktivität verliert.

Ein Vergleich der untersuchten Modellsysteme zeigt deutlich, dass eine Veränderung des pH-Wertes den Gesamthelixanteil zu Versuchsbeginn beeinflusst. Unabhängig davon ist bei Zusatz von Glas während des Lagerungszeitraumes generell eine deutliche Konformationsänderung des Modellproteins Lysozym zu messen. Abbildung 4-24 zeigt eine Zusammenfassung aller PBS-Lösungen bei Glaskontakt.

Aus den Messergebnissen mit Topas<sup>®</sup> als Oberflächenmaterial ergibt sich über die gesamte Versuchsdauer hinweg keine Adsorption des Lysozyms aus der Lösung. Das Protein wird in allen Systemen vollständig wiedergefunden.

Auch bei den CD-Messungen sind keine nennenswerten Veränderungen festzustellen; der Helixanteil bleibt nahezu konstant (siehe Abbildung 4-25). Daraus kann geschlossen werden, dass bei einem Zusatz von Topas<sup>®</sup>, unabhängig vom pH-Wert, anscheinend keine Denaturierung bzw. Entfaltung des Proteins stattfindet. Die negativen Werte zeigen, dass der Helixanteil in Gegenwart von Topas<sup>®</sup> sogar während der Lagerung, verglichen mit Lösungen ohne Zusatz von PPM, z.T. ein wenig ansteigen kann und das Protein möglicherweise weiter stabilisiert wird.

Anders als sonst ermittelt, liegt die Aktivität mit Topas<sup>®</sup> schon zu Beginn der Messung niedriger als ohne Zusatz, bleibt aber während der Lagerung annähernd konstant.

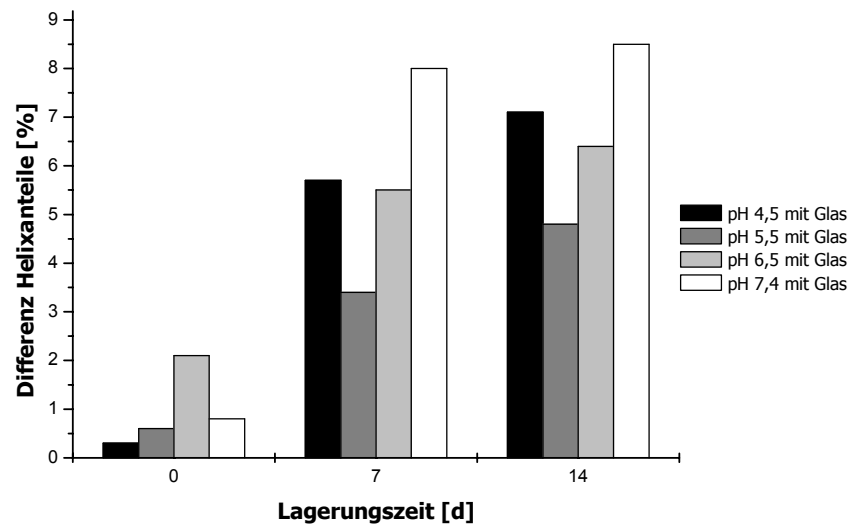


Abbildung 4-24: Differenz der Mittelwerte der Helixanteile von Lysozym (0,1 mg/ml) bei verschiedenen pH-Werten mit Glaszusatz (n=6).

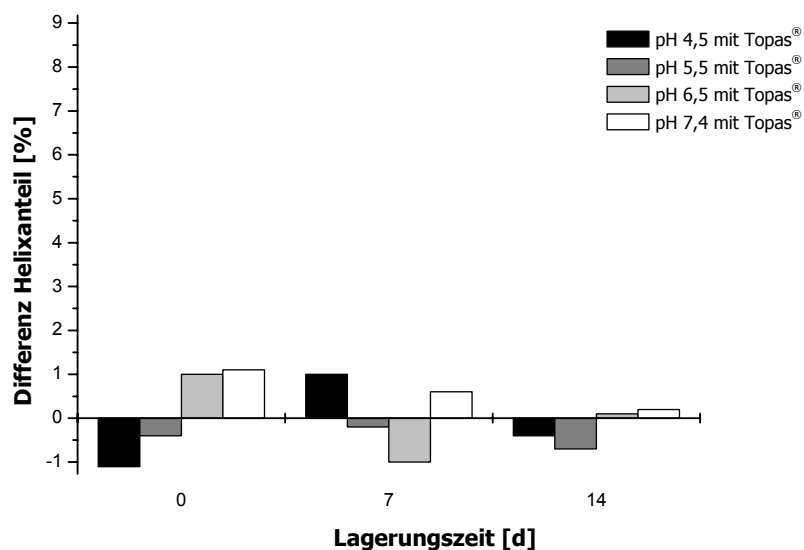


Abbildung 4-25: Differenz der Mittelwerte der Helixanteile von Lysozym (0,1 mg/ml) bei verschiedenen pH-Werten mit Topas®-Zusatz (n=6).

#### 4.2.1.5 Einfluss der Ionenstärke

Um den Einfluss der Ionenstärke auf die Konformation von Lysozym zu untersuchen, wird das Protein in wässrigen Natriumchlorid-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen gelagert. Eingesetzt werden Lösungen mit einer Kochsalz-Konzentration von 1,2 %, 0,9 %, 0,45 % und 0,1125 % (m/m).

Bei der Lagerung von Lysozym in 1,2 % NaCl kann bei den Systemen ohne PPM-Zusatz und mit Topas® eine annähernd gleich bleibende Konzentration während des Lagerungszeitraumes festgestellt werden. Die Addition von Glas zeigt einen anfänglichen leichten Anstieg der Konzentration, der nach einer Woche wieder absinkt.

Die Proteinkonzentration bleibt während der gesamten Lagerungsdauer auch in physiologischer Kochsalzlösung sowohl mit als auch ohne PPM-Oberfläche konstant.

Bei weiterer Absenkung des Elektrolytgehaltes (0,45 % NaCl) werden folgende Ergebnisse erhalten (siehe Abbildung 4-26): Bei der Lysozymlösung ohne Zusatz wird eine geringere Konzentration nachgewiesen als zu Beginn eingesetzt wurde. Diese bleibt aber während der Lagerung konstant. Bei Glaszusatz wird eine Abnahme der Proteinkonzentration erhalten. Topas® zeigt keinerlei Einfluss, die Proteinkonzentration bleibt konstant.

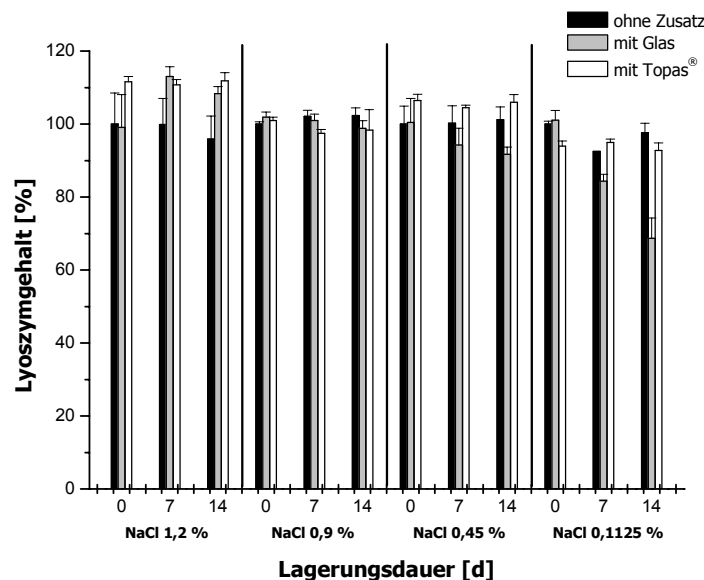


Abbildung 4-26: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in verschiedenen NaCl-Lösungen mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Bei der Lagerung von Lysozym in NaCl 0,1125 % bleibt die Proteinkonzentration nur in reiner Lösung ohne Zusatz und mit dispergiertem Topas® annähernd konstant.

Bei der Lagerung mit Glas erfolgt auch hier ein Abfall der Kurve. Bereits zu Beginn der Lagerung ergibt sich bei Glaskontakt eine Konzentrationsabnahme, die sich im Verlauf der 14-tägigen Lagerung weiter verstärkt.

Der Einfluss einer hypertonen Lösung auf die Proteinkonformation wird mit einer 1,2 %-igen Kochsalzlösung untersucht. Abbildung 4-27 zeigt das Ergebnis. Nach einem anfänglichen Absinken des Helixanteils aller drei untersuchten Systeme, zeigt die Lösung ohne PPM einen konstanten Verlauf. Dieses gilt auch für Topas®. Ein Glaszusatz bewirkt einen nur geringen Abfall des helikalen Strukturanteils. Nach 14 Tagen Lagerungsdauer sind nur ca. 3,5 % der nativen  $\alpha$ -Helix verloren gegangen.

Bei der Lagerung von Lysozym in physiologischer Kochsalzlösung ergibt sich der in Abbildung 4-28 dargestellte Kurvenverlauf. Das System ohne PPM zeigt über die gesamte Lagerungsdauer hinweg einen konstanten Helixanteil. Erstaunlicherweise ist bei der Lagerung des Lysozyms in physiologischer Kochsalzlösung mit Glas nur eine sehr geringe Abnahme der Helixstruktur zu beobachten, die nach 7 und 14 Tagen lediglich 2,5 % beträgt (siehe Abbildung 4-28). Auch der Zusatz von Topas® ergibt keine nennenswerte Abnahme der Helixstruktur im untersuchten Lagerzeitraum.

Bei der Lagerung des Proteins in 0,45 % NaCl-Lösung zeigt sich, dass die Sekundärstruktur des Lysozyms bei den Systemen ohne Zusatz und mit Topas® annähernd erhalten bleibt (siehe Abbildung 4-29).

Es ist weiterhin zu erkennen, dass bei der Zugabe von Glas eine dramatische Abnahme des Helixanteils erfolgt. Der Gesamtgehalt an  $\alpha$ -Helixstruktur fällt von knapp 32 % am Tag der Herstellung auf nur 11 % nach 14 Tagen Lagerung, was einem Strukturverlust von 66 % gleich kommt.

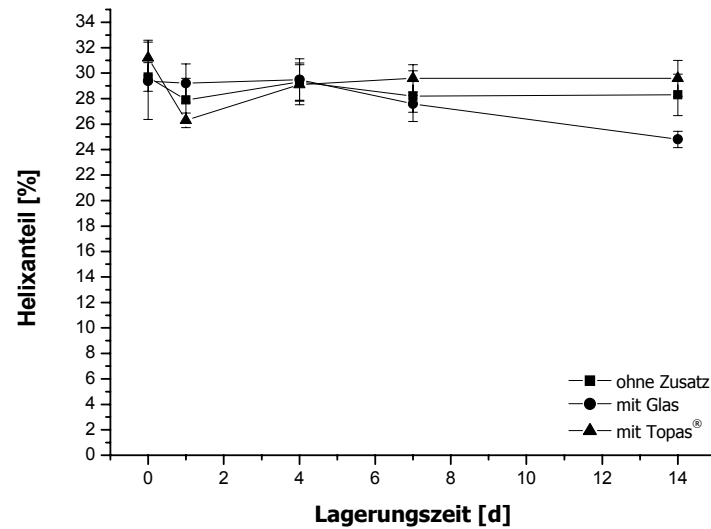


Abbildung 4-27: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in NaCl-Lösung 1,2 % mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

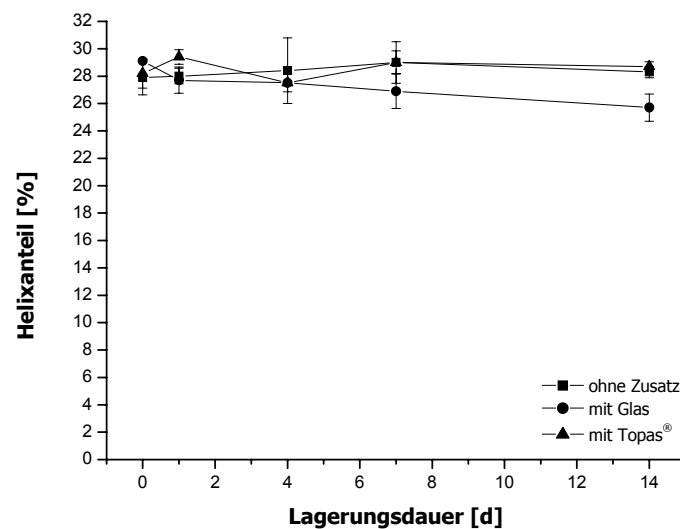


Abbildung 4-28: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger NaCl-Lösung 0,9 % mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).



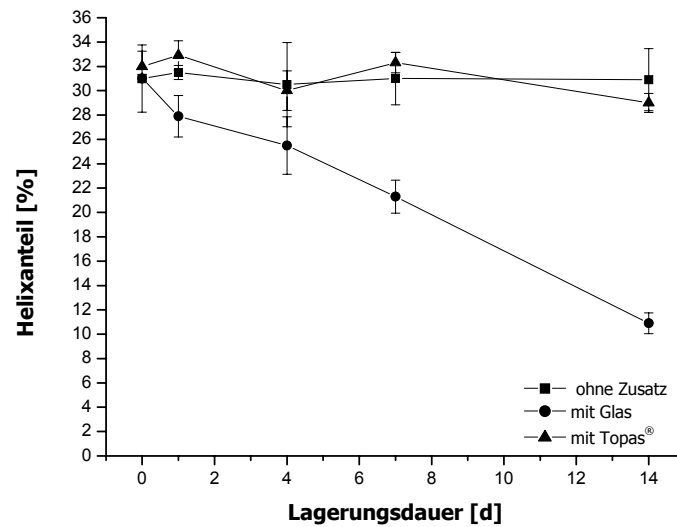


Abbildung 4-29: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger NaCl-Lösung 0,45 % mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Ein ähnliches Bild wie bei der Natriumchlorid-Lösung 0,45 % ist bei der Lösung mit 0,1125 % Natriumchlorid zu beobachten (siehe Abbildung 4-30).

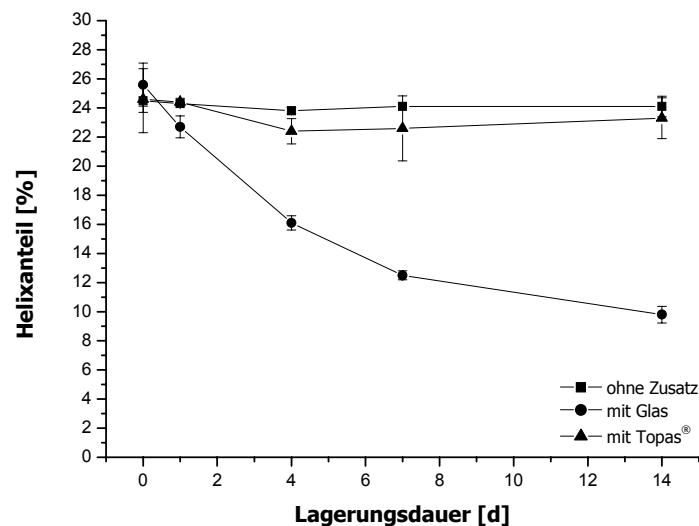


Abbildung 4-30: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger NaCl-Lösung 0,1125 % mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Im Vergleich zur Referenz zeigt sich bei Glaszusatz auch hier eine Abnahme der Helixstruktur des Proteins. An Tag 4 hat sich der Helixanteil bereits um ca. 8 % verringert. Der Gesamtstrukturgehalt sinkt von ca. 25 % auf knapp 10 %, was einen strukturellen Verlust von 40 % bedeutet.

Topas<sup>®</sup> hat auch bei einer 0,1125 %-igen NaCl-Lösung keinen wesentlichen Einfluss auf die Helixstruktur von Lysozym und erscheint als PPM auch in diesem Fall besser geeignet zu sein.

Die Lagerung von Lysozym in 1,2 %iger NaCl-Lösung und in Kombination mit Glasperlen führt zu einer deutlich verminderten Aktivität, die nach einer Woche jedoch weitestgehend konstant bleibt (siehe Abbildung 4-31).

Vergleicht man die Aktivität in Gegenwart von Topas<sup>®</sup> mit der Lösung ohne PPM-Zusatz so zeigt sich hier erneut ein nur geringer Abfall zu Beginn, ein Anstieg erfolgt dann während der weiteren Lagerung.

Bei der Lagerung von Lysozym in physiologischer Kochsalzlösung ist in reiner Lösung und mit Topas<sup>®</sup>-Zugabe kein Aktivitätsverlust zu erkennen. Glas allerdings bewirkt auch hier einen leichten Aktivitätsverlust (siehe Abbildung 4-32).

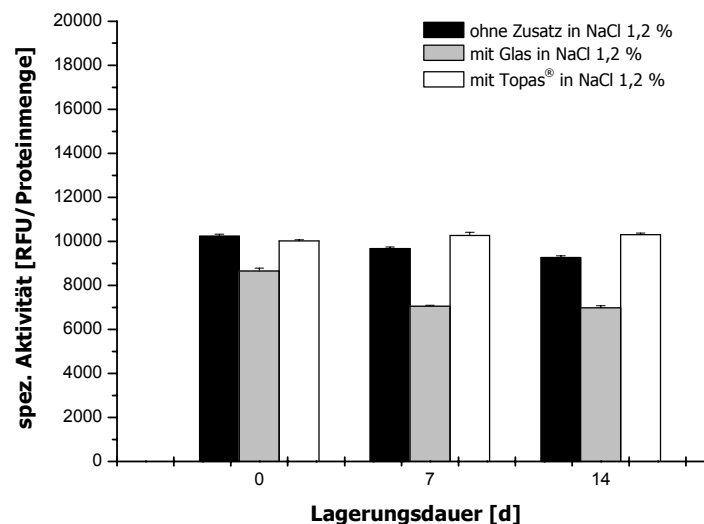


Abbildung 4-31: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger NaCl-Lösung 1,2 % mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6).

Die Lysozymlösung mit 0,45 % NaCl und das entsprechende System mit einem Zusatz von Topas<sup>®</sup> zeigen kaum eine Veränderung der Aktivität während der Lagerung (siehe Abbildung 4-33).

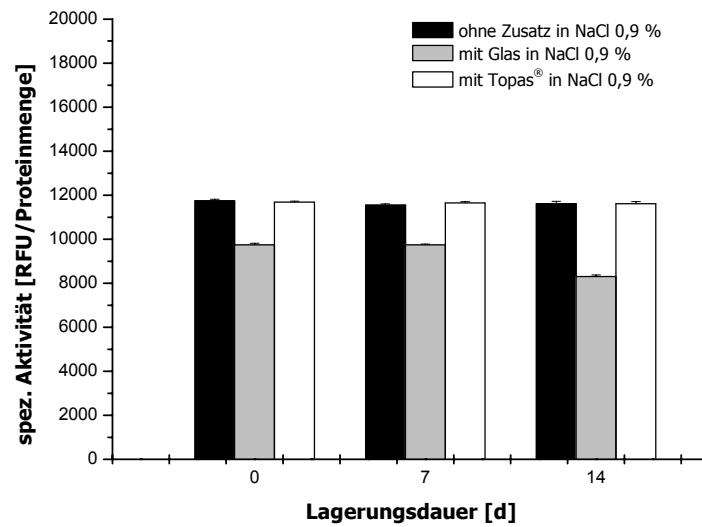


Abbildung 4-32: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger NaCl-Lösung 0,9 % mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

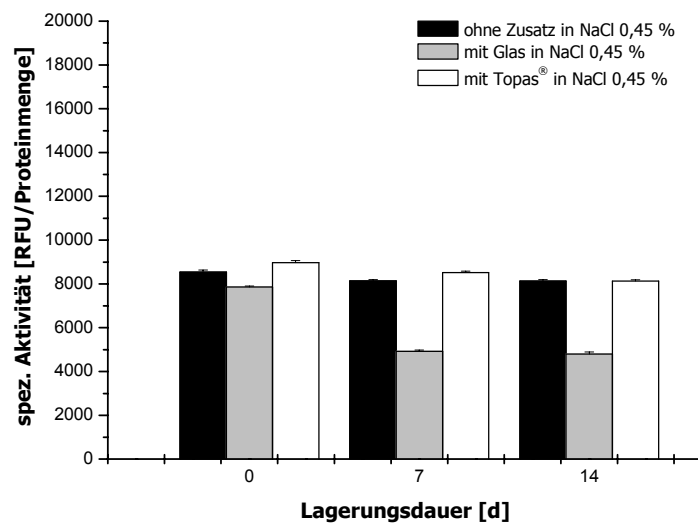


Abbildung 4-33: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger NaCl-Lösung 0,45 % mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Allerdings ist verglichen mit einer rein wässrigen Lösung ohne Hilfsstoffzusatz eine verminderte enzymatische Aktivität erkennbar (siehe Abbildung 4-10). Die Aktivität der Lösung nimmt bei Glaszugabe während der Lagerung deutlich ab.

Eine weitere Reduktion des NaCl-Gehaltes (0,1125 %) wirkt sich nachteilig auf die Aktivität von Lysozym in Gegenwart von Glas aus. Während die Lysozymlösung bei Kontakt mit Glas einen Wirkverlust von fast 75 % erfährt, kann bei der Lagerung mit bzw. ohne Topas® keine Änderung der Aktivität festgestellt werden (siehe Abbildung 4-34).

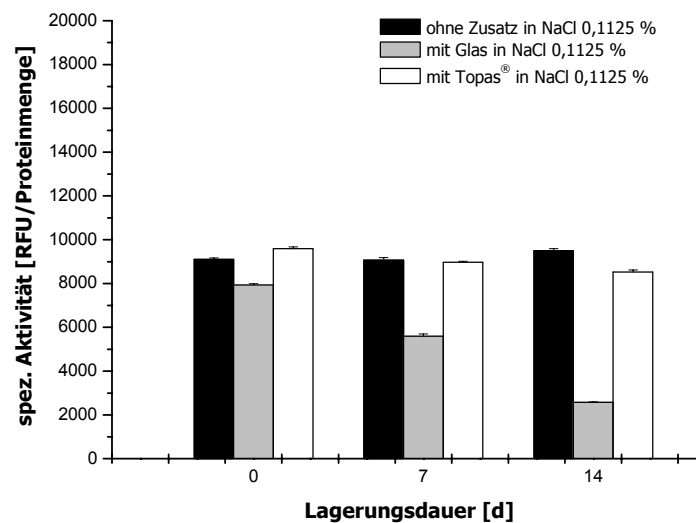


Abbildung 4-34: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger NaCl-Lösung 0,1125 % mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

#### 4.2.1.6 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit verschiedenen Ionenstärken

Die Lysozymlösungen ohne Zusatz eines PPM zeigen während des gesamten Untersuchungszeitraumes auch bei verschiedenen Ionenstärken kaum Veränderungen in der Sekundärstruktur, Konzentration und der spezifischen Aktivität des Lysozyms.

Die Zugabe von Topas®-Granulat bedingt bei keinem der kochsalzhaltigen Systemen eine Abnahme der Lysozymkonzentration. Außerdem bewahrt das Enzym in diesen Lösungen sowohl seine Konformation als auch seine Aktivität.

Duncan et al. (1995) konnten bei Untersuchungen mit BSA und Glas zeigen, dass mit steigender Ionenstärke die adsorbierte Proteinmenge absinkt, was auf elektrostatische Interaktionen schließen lässt. Salze können die Elektrostatik in Proteinen auf zwei Arten beeinflussen, durch unspezifische elektrostatische Abschirmung und spezifische Ionenbindung an das Protein. Bei geringen Konzentrationen bewirken Salze eine elektrostatische Abschirmung und schwächen damit ionische Abstoßung bzw. Anziehung als Gegenionen. Deshalb kann dieser Abschirmeffekt entweder stabilisierend, wenn sonst große abstoßende Wechselwirkungen innerhalb des Proteins zur Entfaltung führen würden, oder destabilisierend wirken, wenn große Salzbrücken oder Ionenpaare das Protein stabilisieren würden.

Bei der spezifischen Ionenbindung können sich Ionen an die Polypeptidkette anlagern, da diese ein großes Dipolmoment besitzt, das aufgrund der teilweise positiven Ladung der Aminogruppe und der z.T. negativen Ladung der Carboxylgruppe resultiert. Möglicherweise kann durch diese Anlagerung eine Destabilisierung des nativen Zustandes erfolgen [Chi et al. 2003], wobei die Anlagerung mit steigender Proteinkonzentration zunimmt.

Außerdem hängt die Intensität der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der Oberfläche des Behältnismaterials und dem Protein deutlich von der Elektrolytkonzentration ab: Die Glasoberfläche liegt bei den hier untersuchten Systemen (pH 6,5) negativ geladen, Lysozym mit positiver Nettoladung vor. Salzionen schirmen die Oberflächenladung des Glases und die positive Nettoladung des Proteins ab und vermindern dadurch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen diesen beiden. Die Bindung sollte somit mit steigendem Salzgehalt abnehmen.

Dieses deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen der glashaltigen Systeme mit 0,45 bzw. 0,1125 % Natriumchlorid, da dort die Lysozymkonzentration deutlich absinkt. Darüber hinaus nimmt die Sekundärstruktur sowie die Proteinaktivität ab. Dieses lässt den Rückschluss zu, dass Lysozym bei niedrigen Kochsalzkonzentrationen (z.B. 0,1125 %) nach der Adsorption an die Glasoberfläche in denaturierter Form wieder desorbiert und hierdurch seine Aktivität verliert.

In noch stärkerem Maße erweist sich eine Kochsalzkonzentration von 0,45 % als destabilisierend. Es kommt in diesem System zu einem starken Konformations- und Aktivitätsverlust des Proteins. Die Adsorption des Proteins scheint begünstigt und eine folgende Denaturierung verändert die native Form des Moleküls.

Erstaunlicherweise verändert sich in Gegenwart der beiden höher konzentrierten Kochsalzlösungen (NaCl 1,2 und 0,9 %) die Proteinkonzentration und -konformation während der Lagerung nicht (siehe Abbildung 4-26, 4-27 und 4-28). Eine geringe Abnahme der spezifischen Aktivität beider Systeme bedeutet allerdings, dass die Umgebungsbedingungen bzw. das Oberflächenmaterial einen gewissen negativen Einfluss auf das Protein ausüben.

Abbildung 4-35 fasst die Ergebnisse der Konformationsänderungen von Lysozym in Kombination mit Glas bzw. Topas® in den verschiedenen Salzlösungen zusammen.

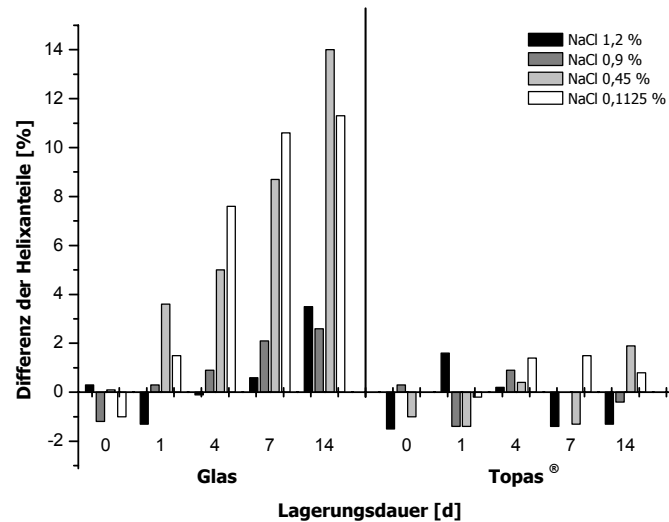


Abbildung 4-35: Differenz der Mittelwerte der Helixanteile von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässrigen Natriumchlorid-Lösungen verschiedener Ionenstärken mit Topas®- und Glaszusatz (n=6).

Bei Glas sind die Effekte von der Kochsalzkonzentration abhängig. Während ab einer NaCl-Konzentration von 0,9 % kaum eine Abnahme des Helixanteils zu verzeichnen ist, ist bei sinkender Ionenstärke eine deutliche Konformationsänderung zu beobachten. Der Einsatz von 1,2 und 0,9 % Natriumchlorid hat demnach einen stabilisierenden Effekt. Deutlich zu erkennen ist, dass bei Topas®-Zusatz, unabhängig von der Ionenstärke, keine Denaturierung erfolgt.

Aus den Ergebnissen des Einflusses unterschiedlicher Ionenstärken geht hervor, dass das Modellsystem mit 0,9 % NaCl die günstigsten Bedingungen für Lysozym darstellt. Sowohl bei Glas- als auch bei Topas®-Zugabe ergibt sich über den gesamten Lagerzeitraum eine nur minimale Wechselwirkung des Proteins mit der Primärpackmitteloberfläche. Bei den Systemen mit Glaszusatz verbleibt das Protein in seiner nativen gefalteten Struktur und zeigt keine Änderung seiner Sekundärstruktur und spezifischen Aktivität. Diese Salzkonzentration bzw. Ionenstärke scheint keine destabilisierende Wirkung auf das Enzym auszuüben.

#### 4.2.2 Grenzflächenaktive Hilfsstoffe

Untersuchungen mit wässrigen Lösungen bzw. Phosphat-gepufferten Lösungen legen nahe, dass es insbesondere in Gegenwart von Glas zu Adsorptions- und Desorptionsvorgängen mit Veränderung der Konformation kommt. Zur Verminderung dieser Wechselwirkung eignen sich grenzflächenaktive Hilfsstoffe. Beispielhaft werden Polysorbat 80, Poloxamer 407 und Polyvinylpyrrolidon (PVP) untersucht, die z.T. bereits bei der Herstellung und Aufarbeitung rekombinanter Proteine zugesetzt werden, um eine Proteinadsorption an Gefäßen bzw. Chromatographiesäulen zu verhindern bzw. weitestgehend zu verringern [Gloger 2002].

##### 4.2.2.1 Polysorbat 80

Polysorbate sind eine wichtige Gruppe nichtionischer Tenside, die heutzutage vermehrt in der Biotechnologie eingesetzt werden. Sie sind in der Lage die Proteinkonformation in Lösung zu stabilisieren und durch ihre Multifunktionalität die Proteinadsorption zu beeinflussen [Wang 1988, Witthohn et al. 1996, Chi et al. 2003].

Für diese Untersuchungen werden wässrige Polysorbat 80-Lösungen oberhalb der CMC (0,002 % (m/v)) in einer Konzentration von 0,1, 0,05 und 0,01 % (m/v) eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Wechselwirkung von Lysozym am PPM reduziert werden kann.

Die Systeme mit und ohne Topas<sup>®</sup> zeigen keinen Proteinverlust während der Lagerung.

Im Gegensatz dazu sinkt bei allen drei untersuchten Polysorbatkonzentrationen die gelöste Proteinmenge bei Kontakt mit Glas ab. Dieser Effekt nimmt mit sinkender Tensidkonzentration zu (siehe Abbildung 4-36).

In Analogie zu den Adsorptionsuntersuchungen zeigt das Protein in allen Systemen mit und ohne Topas<sup>®</sup> unabhängig von der Polysorbatkonzentration auch keine Änderung in seiner Konformation.

Bei der Zugabe von Glas zeigt sich jedoch während der Lagerung eine Veränderung der Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Polysorbatkonzentration. Die Lysozym-Systeme mit 0,05 und 0,01 % Polysorbat bewirken eine stärkere Konformationsänderung des Proteins im Vergleich mit der Lösung mit 0,1 % Polysorbat (siehe Abbildung 4-37).

Bei Vergleich der verschiedenen Polysorbatkonzentrationen mit reinem Wasser und Glaszusatz ist deutlich zu erkennen, dass trotz des Tensidzusatzes eine Konformationsänderung auftritt. Nach 14 Tagen Lagerung ist bei 0,1 % Tween der geringste Verlust an  $\alpha$ -Helix mit ca. 11 % zu beobachten. Dieser Wert ist sogar niedriger als bei der rein wässrigen Lösung ohne Zusatz.

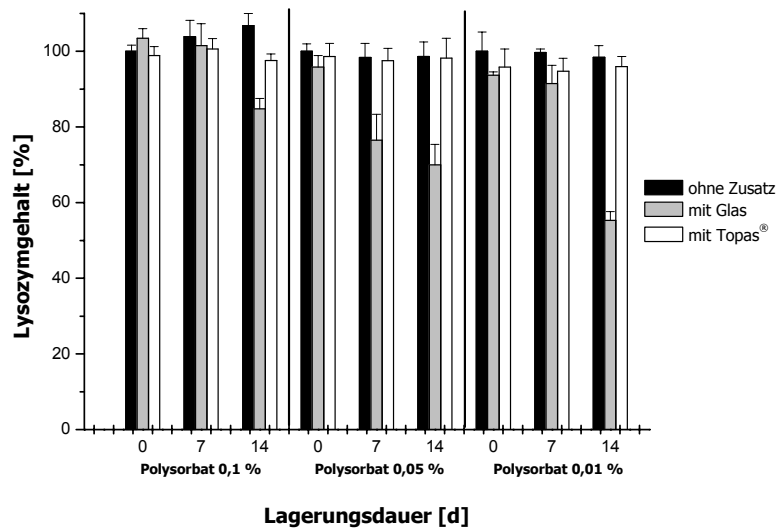


Abbildung 4-36: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in Polysorbat 80-Lösungen unterschiedlicher Konzentration mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

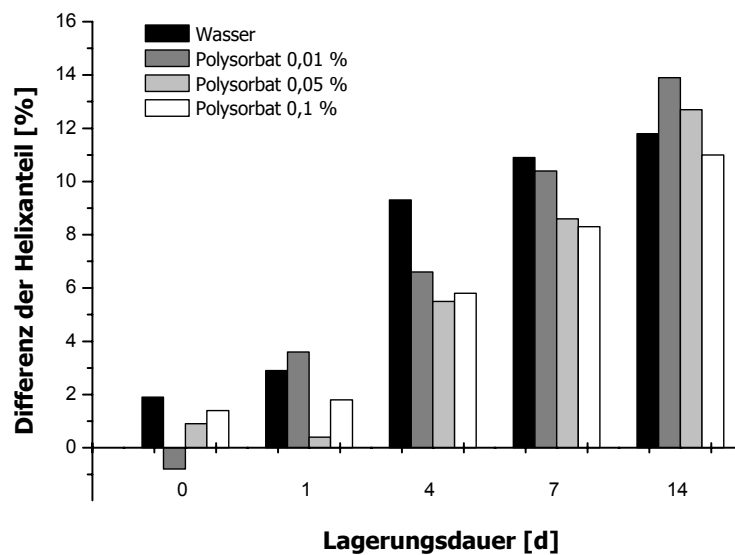


Abbildung 4-37: Differenz der Mittelwerte der Helixanteile von Lysozym (0,1 mg/ml) in unterschiedlichen Polysorbatkonzentrationen mit Glaszusatz (n=6).



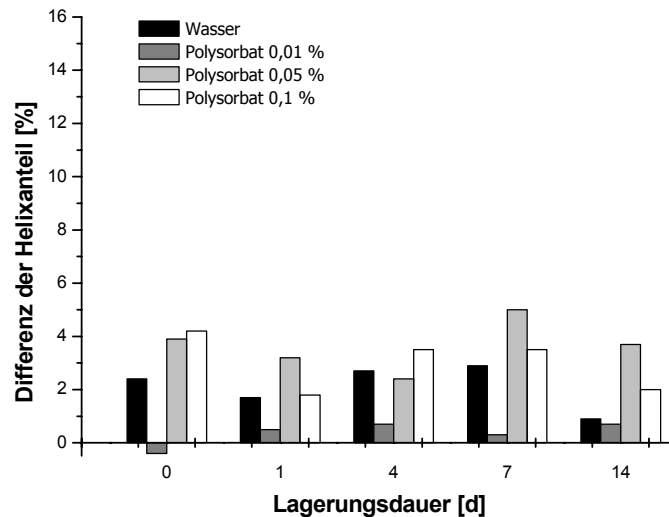


Abbildung 4-38: Differenz der Mittelwerte der Helixanteile von Lysozym (0,1 mg/ml) in unterschiedlichen Polysorbatkonzentrationen mit Topas<sup>®</sup>-Zusatz (n=6).

In Abbildung 4-38 ist das Ausmaß der strukturellen Veränderung des Lysozyms bei Topas<sup>®</sup>-Zugabe dargestellt.

Bei der Lagerung der reinen Lysozymlösung ohne PPM-Zusätze, ist eine immer gleich bleibende Aktivität zu messen, die in 0,1 %-iger Polysorbatlösung ein wenig höher liegt als bei den geringer konzentrierteren Lösungen (siehe Abbildung 4-39). Bei keiner der untersuchten Polysorbatkonzentration führt die Addition dieses Kunststoffes zu einer starken Veränderung der Konformation. Die maximale Veränderung von ca. 5 % wird in Anwesenheit von 0,05 % Polysorbat beobachtet. Offensichtlich beeinflusst dieses Tensid im untersuchten Konzentrationsbereich kaum die Wechselwirkungen des Proteins mit der PPM-Oberfläche, zumindest geht dies nicht mit einer Denaturierung einher.

Im Gegensatz dazu zeigen alle tensidhaltigen Systeme, denen Glasperlen zugesetzt wurden, einen deutlichen Aktivitätsverlust (siehe Abbildung 4-40). Nach zweiwöchiger Lagerung ist nur noch 1/3 der Anfangsaktivität zu messen. Am Tag der Herstellung ist bei der höchsten Tensidkonzentration (0,1 %) die höchste Aktivität zu messen, die niedrigste findet man im System mit 0,01 % Polysorbat und Glaszusatz. Diese Werte nivellieren sich aber am Ende des Untersuchungszeitraumes wieder.

Die Zugabe von Topas<sup>®</sup> wirkt sich kaum negativ auf die Aktivität der Lysozymlösung aus. Lediglich bei der höchsten Polysorbatkonzentration (0,1 %) ist ein leichter Abfall während der Lagerung zu messen, wobei am Ende bei allen untersuchten Polysorbatkonzentrationen eine vergleichbare spezifische Aktivität erhalten bleibt.

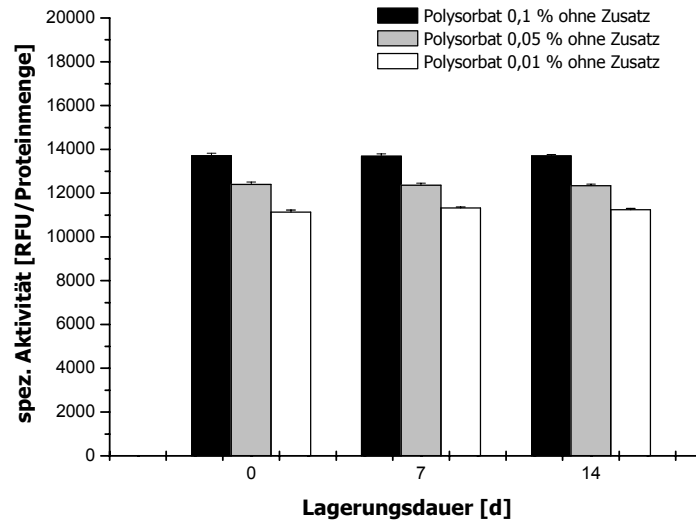


Abbildung 4-39: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in Polysorbat 80-Lösungen unterschiedlicher Konzentration ohne PPM-Zusatz (n=6).

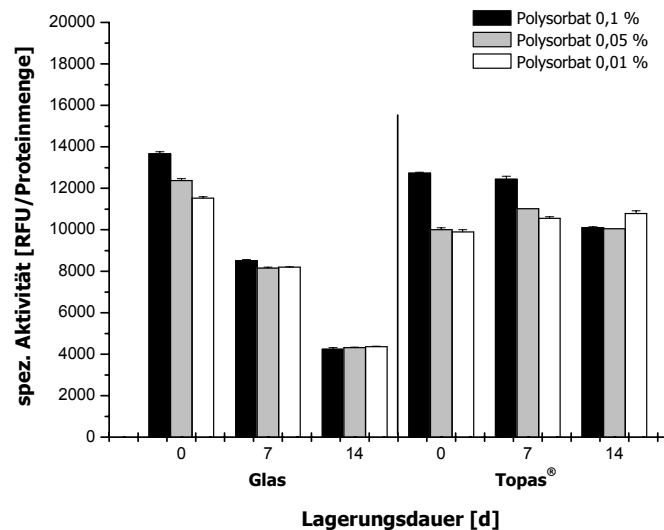


Abbildung 4-40: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in Polysorbat 80-Lösungen unterschiedlicher Konzentration mit Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

#### 4.2.2.2 Poloxamer 407

Es soll hier untersucht werden, welchen Einfluss das amphiphile Block-Copolymer Poloxamer 407 auf das Adsorptionsverhalten von Lysozym hat. Es besitzt im Vergleich zu Polysorbat 80 eine geringere Grenzflächenaktivität.

Die Systeme mit und ohne Topas<sup>®</sup> zeigen während der Lagerung eine konstante Lysozymkonzentration (siehe Abbildung 4-41).

Poloxamer kann in Gegenwart der Glasperlen einen geringen Abfall der Proteinkonzentration nicht verhindern.

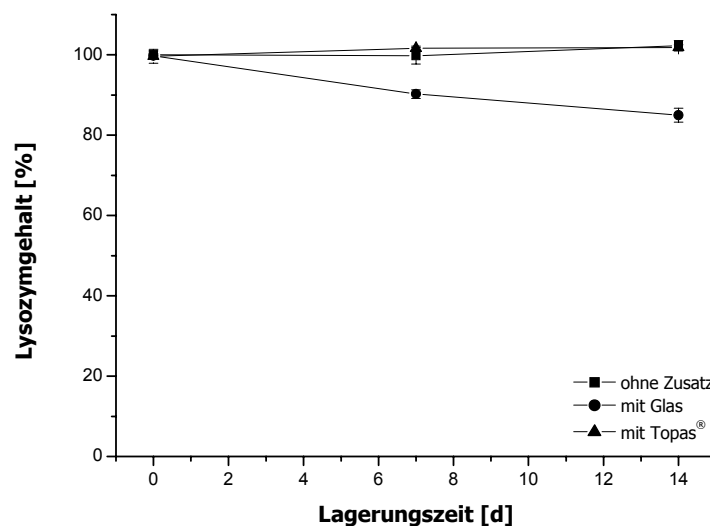


Abbildung 4-41: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in 0,001 % Poloxamer mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6).

In Abbildung 4-42 ist die Differenz der Helixanteile für die Systeme mit Glas bzw. Topas<sup>®</sup>-Zugabe dargestellt. Während Topas<sup>®</sup> in Kombination mit Poloxamer 407 zu fast keiner Konformationsänderung des Enzyms führt, bewirkt ein Glaszusatz eine starke Veränderung der  $\alpha$ -Helix-Sekundärstruktur der Lysozymlösung.

Enzymlösungen mit und ohne Topas<sup>®</sup> zeigen während des Untersuchungszeitraums eine konstante Aktivität (siehe Abbildung 4-43).

In Kombination mit Glas kann Poloxamer wiederum ein Absinken der Lysozymaktivität nicht verhindern. Die spezifische Aktivität sinkt bei Glaskontakt im Laufe der Lagerung im Vergleich zur reinen Lösung deutlich ab.

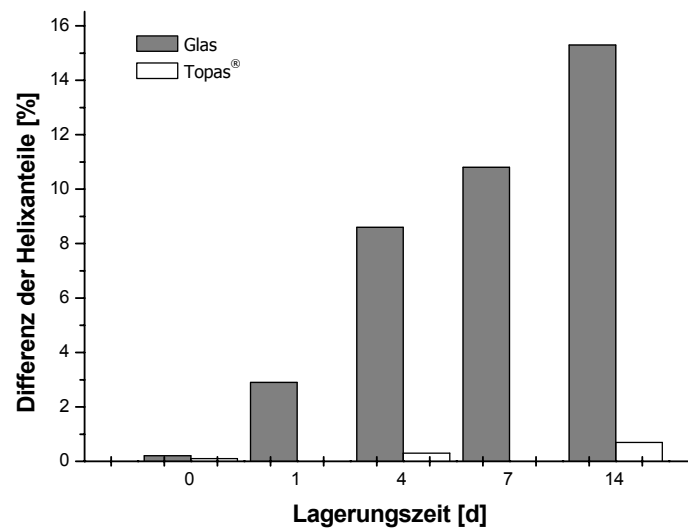


Abbildung 4-42: Differenz der Mittelwerte der Helixanteile von Lysozym (0,1 mg/ml) in 0,001 % Poloxamer-Lösung mit Topas®- und Glaszusatz (n=6).

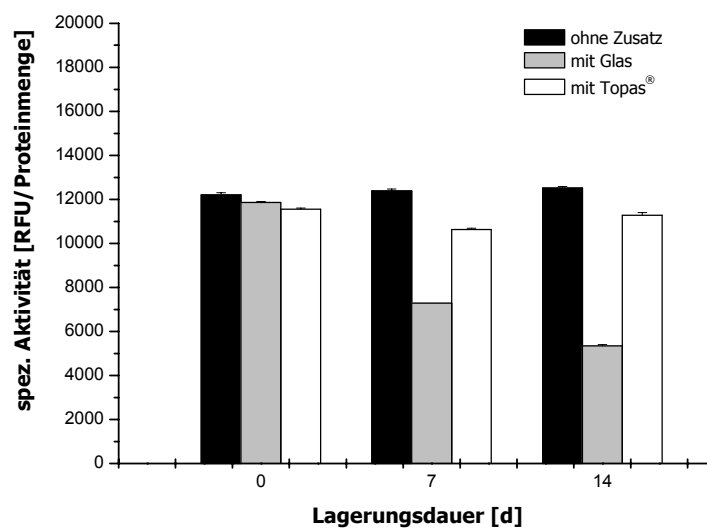


Abbildung 4-43: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in 0,001 % Poloxamer mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

#### 4.2.2.3 Polyvinylpyrrolidon

Wie bei dem Einsatz anderer grenzflächenaktiver Hilfsstoffe beschrieben wird, ist eine Verringerung der Proteinadsorption durch Anlagerung des PVP an die Oberfläche von Primärpackmitteln zu erreichen [Wang 1988]. Polyvinylpyrrolidon (PVP) wird bei diesen Untersuchungen in einer Konzentration von 0,025 % eingesetzt und besitzt im Vergleich mit den bereits genannten Hilfsstoffen die geringste Grenzflächenaktivität.

Der Zusatz von PVP zur reinen Lysozymlösung bewirkt einen leichten Abfall der Proteinkonzentration zu Beginn der Lagerung, die sich aber im Laufe der Lagerung auf einen konstanten Wert einpendelt. Die Lysozymkonzentrationen bei Glas- bzw. Topas®-Zusatz bleiben über die Lagerungsdauer hinweg konstant, so dass die PPM zu keinem zusätzlichen Konzentrationsverlust während der Lagerung führen (siehe Abbildung 4-44).

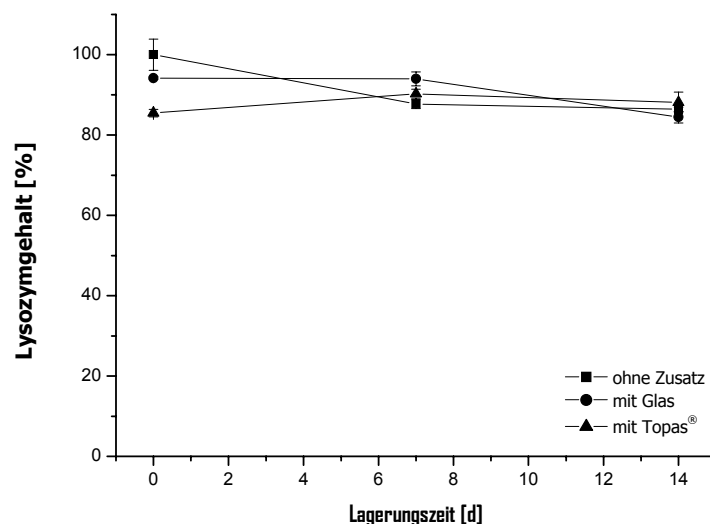


Abbildung 4-44: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) in 0,025 % PVP mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Abbildung 4-45 zeigt die Höhe des Helixanteils von Lysozym während der Lagerung in Systemen mit PVP. Auffällig ist hierbei, dass der Gesamthelixanteil von Lysozym in rein wässriger Lösung deutlich höher liegt als in Gegenwart von 0,025 % PVP. Der Polymerzusatz reduziert den Gesamthelixanteil von Lysozym um fast 10 %, was auf eine generelle Entfaltung des Proteins in diesem Medium hindeutet. Während der Lagerung bleibt diese Sekundärstruktur des Lysozym in Abwesenheit der PPM-Materialien allerdings erhalten. Auch ein To-

pas<sup>®</sup>-Zusatz nimmt keinen negativen Einfluss auf die Konformation. Der prozentuale  $\alpha$ -Helixanteil zeigt über die Messdauer keinen Abfall.

Die Zugabe von Glas bewirkt wiederum eine deutliche Abnahme der Helixstruktur. Dieser Verlust beträgt nach 14 Tagen fast 11 %.

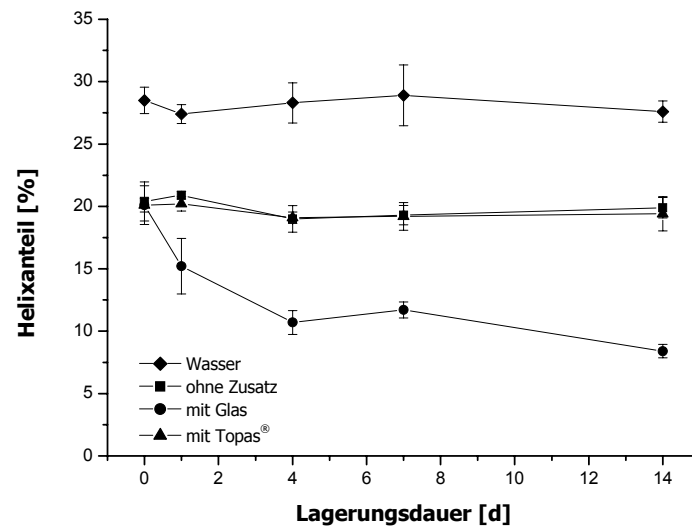


Abbildung 4-45: Helixanteil von Lysozym (0,1 mg/ml) in 0,025 % PVP mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6). Als Vergleichskurve dient Lysozym (0,1 mg/ml) in Wasser (n=6).

Hinsichtlich der Aktivität der Lysozymbösungen nach Zusatz von PVP werden die in Abbildung 4-46 gezeigten Resultate erhalten. Analog zu den bereits beschriebenen Ergebnissen zeigt die reine Enzymlösung in PVP kaum eine Veränderung ihrer spezifischen Aktivität.

Bei der Zugabe von Glas ist ein deutlicher Abfall der enzymatischen Aktivität der Lösung zu beobachten. Verglichen mit dem System ohne Zusatz, ergibt sich in Kombination mit Glas bereits zu Beginn der Messungen eine geringere Aktivität, die im Verlauf der Lagerung kontinuierlich absinkt.

Ein Topas<sup>®</sup>-Zusatz bewirkt zu Anfang der Lagerung ebenfalls eine verminderte Aktivität. Diese steigt im Laufe der Lagerung wieder an, ohne jedoch das Niveau der reinen Lösung zu erreichen.

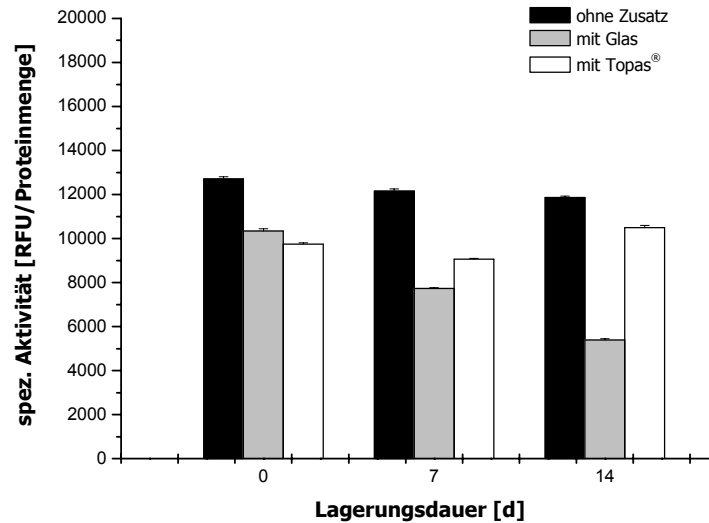


Abbildung 4-46: Spezifische Aktivität von Lysozym (0,1 mg/ml) in 0,025 % PVP-Lösung mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

#### 4.2.2.4 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit grenzflächenaktiven Hilfsstoffen

Lysozym weist wie viele andere Proteine eine amphiphile Struktur auf. Deshalb reichert sich die Substanz an Phasengrenzflächen an und wird aus Lösungen, insbesondere an Feststoffoberflächen, adsorbiert. Um dies zu verhindern, wird Proteinlösungen häufig eine weitere grenzflächenaktive Substanz zugesetzt. Solche Hilfsstoffe sollen selbst bevorzugt an Feststoffoberflächen adsorbieren und dadurch die Anlagerung des Proteins verhindern. Häufig wird proteinogenen Wirkstofflösungen ein kleineres Protein zugesetzt, um dieses Prinzip zu realisieren. Das kleine Protein (z.B. Albumin) verhindert so eine Adsorption des eigentlichen Proteinwirkstoffes durch Belegung der Oberflächen des PPM [Witthohn et al. 1996]. Für diesen Einsatzzweck erscheinen grundsätzlich aber auch nicht-proteinogene Hilfsstoffe wie Polysorbat 80, Poloxamer 407 und PVP geeignet und werden daher in den eigenen Untersuchungen eingesetzt. Die drei Substanzen unterscheiden sich in ihrer Grenzflächenaktivität und ihrer Molmasse. Dies lässt einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Adsorption dieser Substanzen und die Intensität der Wechselwirkung erwarten.

Ein direkter Einfluss auf die Lagerstabilität des Lysozyms kann bei allen drei Hilfsstoffen ausgeschlossen werden, da in den Modellsystemen ohne Zusatz eines PPM während der untersuchten Lagerungszeit Konzentration, Konformation und Aktivität im Rahmen der Messgenauigkeit unverändert bleiben.

Polysorbat ( $M_r$  1310 Da) ist im Vergleich zu Lysozym ( $M_r$  14310 Da) kleiner und kann in Lösung somit schneller diffundieren. Es hat zusätzlich eine höhere Grenzflächenaktivität. Die Physisorption dieses klassischen Tensids an Feststoffoberflächen verläuft typischerweise reversibel. Die Lage des Adsorptionsgleichgewichts ist konzentrationsabhängig. Diese spiegelt sich sehr deutlich in den glashaltigen Systemen wieder, da auch dort eine klare Abhängigkeit von der Tensidkonzentration beobachtet wird. Je geringer die Konzentration an grenzflächenaktiver Substanz in Lösung, desto stärker ist die Abnahme der Lysozymkonzentration, die mit einer Verringerung der Konformation und spezifischen Aktivität einhergeht. Die geringste Adsorption wird mit Polysorbat 0,1 % erzielt. Offensichtlich findet eine kompetitive Adsorption an der Glasoberfläche statt. Da jedoch beide Substanzen, Lysozym und Polysorbat 80, reversibel an Glas binden, lässt sich eine Denaturierung des proteinogenen Arzneistoffes und ein Wirkverlust nicht vermeiden. Geringe Tensidkonzentrationen führen im Gegenteil dazu, dass die Desorption von denaturiertem Lysozym begünstigt wird und somit die Inaktivierung schneller abläuft als in Abwesenheit des Tensids.

In analoger Weise ist vermutlich der unerwartet negative Einfluss des Polysorbats auf die Stabilität von Lysozym in Gegenwart von Topas<sup>®</sup> zu interpretieren. Dort wird bei einem Zusatz von 0,1 % Polysorbat 80 trotz einer konstant bleibenden Lysozymkonzentration und -konformation eine nachteilige Beeinflussung der Enzymaktivität beobachtet.

Darüber hinaus ist zu noch die Möglichkeit zu bedenken, dass, wie Ha et al. (2002) beschreiben, eine Destabilisierung von Proteinen auch durch vorhandene Peroxide hervorgerufen werden kann. Diese können sich aufgrund des Herstellungsprozesses in kleinen Mengen in der Polysorbat-Lösung befinden und in Gegenwart von Sauerstoff und Licht oxidationsempfindliche Proteine denaturieren. Je verdünnter die Polysorbat-Lösung ist, desto schneller bilden sich mehr Peroxide [Ha et al.]. Eine mögliche Bildung von Peroxiden könnte bei verdünnten Lösungen (Polysorbat 0,05 und 0,01 %) auch zu einer Konformationsänderung und somit zu einem Strukturverlust des Lysozyms geführt haben. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass Veränderungen während der Lagerung nur in Systemen mit PPM-Materialien auftraten.

Somit kann Polysorbat 80 nur in solchen Systemen von Vorteil sein, bei denen Konzentrationsverluste durch Adsorption kritisch sind und eine reversible Adsorption nicht mit einer Denaturierung einhergeht. Dies trifft für Substanzen, die sich ähnlich verhalten wie Lysozym, nicht zu, was letztlich gegen einen unkritischen Einsatz dieses Hilfsstoffes spricht.

Die Polymere PVP ( $M_r$  55 kDa) und Poloxamer 407 ( $M_r$  9840-14600 Da) diffundieren aufgrund ihrer Molekularmasse bzw. der niedrigen Einsatzkonzentration langsamer an die Ober-



fläche des PPM als Lysozym. Dennoch sind solche Polymere auch in der Lage, bereits an der Grenzfläche befindliche (noch) native Proteine zu verdrängen und eine weitere Bindung eines proteinogenen Arzneistoffes an die PPM-Oberfläche durch ihre eigene Anlagerung zu verhindern. Dieses wird insbesondere dadurch begünstigt, dass mit steigender Molmasse die Bindungsenergie steigt und eine Desorption immer unwahrscheinlicher wird, da hierzu alle vorhandenen Bindungsstellen gleichzeitig gelöst werden müssten. Bei mehr als zehn Bindungsstellen kann daher von einer praktisch irreversiblen Adsorption ausgegangen werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit PVP und Poloxamer in Kombination mit Glas zeigen allerdings keinen positiven Effekt der Hilfsstoffe auf das Protein. Trotz geringer Konzentrationsverluste, sind starke Veränderungen in der Proteinkonformation und spezifischen Aktivität zu erkennen. Keiner der zugesetzten Hilfsstoffe ist in der Lage, die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und Glas zu reduzieren. Das molare Verhältnis von PVP/Lysozym (0,63) ist ca. 6 Mal größer als von Poloxamer/Lysozym (0,1). Es wird in Gegenwart von PVP zwar eine gleich bleibende Proteinkonzentration bestimmt, dennoch lassen sich ein Konformations- und Aktivitätsverlust messen. Offensichtlich ist der an die Oberfläche des PPM gebundene Lysozymanteil sehr gering, kann aber immer noch desorbiert werden und geht dann in denaturierter Form wieder in Lösung.

Wie stark die Konformationsänderung von Lysozym bei der Lagerung in 0,025 % PVP ausgeprägt ist, zeigt Abbildung 4-47. Dargestellt ist die Differenz der Helixanteile von Lysozym in wässriger Lösung und 0,025 % PVP. Der Verlust an  $\alpha$ -Helix bei Glaskontakt in rein wässriger Lösung liegt absolut gesehen höher als bei der Lagerung in 0,025 %-iger Polyvinylpyrrolidon-Lösung. Das bedeutet, dass die Sekundärstruktur des Enzyms bei Glaskontakt in PVP geringere Veränderungen erfährt als in dem rein wässrigen System, obwohl der Gesamthelixanteil von Lysozym in PVP niedriger liegt.

In Gegenwart des Oberflächenmaterials Topas® erweisen sich Zusätze von Poloxamer 407 und PVP als indifferent. Es erfolgt keine Abnahme des Helixanteils und kein Verlust an spezifischer Aktivität während der Lagerung.

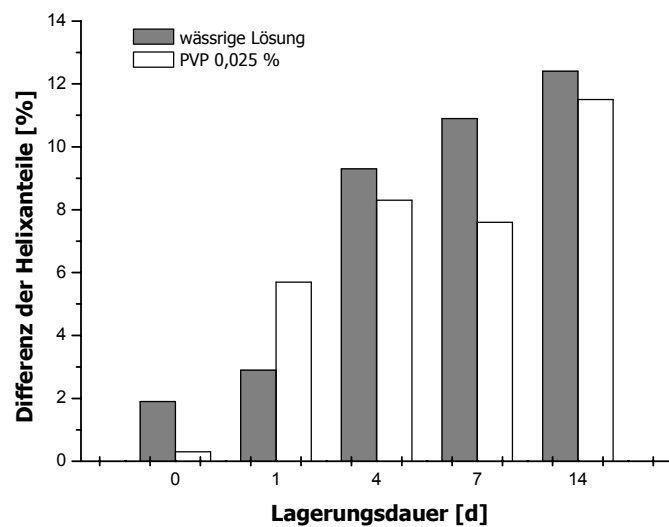


Abbildung 4-47: Differenz der Mittelwerte der Helixanteile von Lysozym (0,1 mg/ml) in wässriger Lösung und 0,025 % PVP jeweils bei Glaszusatz (n=6).

### 4.2.3 Einfluss der Proteinkonzentration

Um zu untersuchen, ob die Proteinkonzentration bei gleich bleibender Glas- bzw. Topas<sup>®</sup>-Menge einen Einfluss auf eine Konformationsänderung hat, wird Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen sowohl in rein wässriger als auch in 0,45 %-iger Kochsalzlösung gelagert.

#### 4.2.3.1 Rein wässrige Systeme

Im nachfolgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Lagerung verschieden konzentrierter Lysozymlösungen in Wasser mit und ohne Zusatz von PPM-Materialien zusammengestellt.

Bei Einsatz von Topas<sup>®</sup> zeigt sich kein relevanter Einfluss auf die Proteinkonzentration im gemessenen Lagerzeitraum. Alle betrachteten Systeme besitzen fast konstant die zu Anfang gemessene Konzentration (siehe Abbildung 4-48).

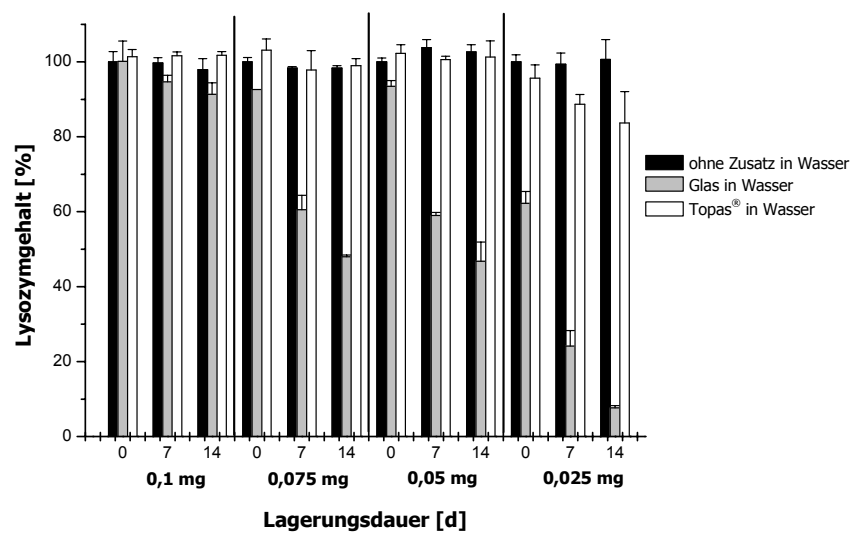


Abbildung 4-48: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) verschiedener Lysozymlösungen unterschiedlicher Konzentration in wässriger Lösung mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Die höchste adsorbierte Menge ( $2,3 \text{ mg/m}^2$ ) ergibt sich in diesen Experimenten bei niedriger Lysozymkonzentration und nach 14-tägiger Lagerung (siehe Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Adsorptionsisothermen der Bindung von Lysozym an Topas® bei Lagerung in Wasser (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

Tag 0		Tag 7		Tag 14	
ads. Menge [mg/m <sup>2</sup> ]	Restkonz. [µg/ml]	ads. Menge [mg/m <sup>2</sup> ]	Restkonz. [µg/ml]	ads. Menge [mg/m <sup>2</sup> ]	Restkonz. [µg/ml]
0,61	26,02	1,60	24,12	2,30	22,77
0	37,97	0	37,35	0	37,62
0	76,34	1,05	72,47	0,37	73,33
0	87,03	0	87,35	0	87,35

Bei Vergleich der verschiedenen Proteinkonzentrationen kann bei Glaskontakt immer eine Abnahme der Lysozymmenge bestimmt werden, wobei der geringste Verlust bei der höchsten Lysozymkonzentration ( $0,1 \text{ mg/ml}$ ) zu beobachten ist (siehe Abbildung 4-48).

Bei dieser Proteinkonzentration zeigen alle Systeme eine nahezu konstante Konzentration. Lediglich die Lösung in Kombination mit Glas lässt nach 14 Tagen einen leichten Abfall erkennen.

Die Lysozymlösung mit 0,05 mg/ml zeigt die gleiche Tendenz. Auch hier ist bereits sofort nach der Herstellung ein Proteinverlust zu verzeichnen, der sich mit Glaskontakt auch noch zusätzlich verstärkt. Bei den Lösungen mit 0,075 und 0,025 mg/ml ohne Zusatz kann die Gesamtmenge an Protein zu Beginn komplett wiedergefunden werden, ein Glaszusatz bewirkt aber wiederum ein starkes Absinken des Proteingehaltes in Lösung.

Systeme mit 0,0125 mg/ml Lysozym in Wasser wurden untersucht, zeigten aber keine auswertbaren Resultate und werden für die weiteren Versuche nicht mehr verwendet.

Die aus den Differenzen zwischen der ermittelten Ausgangskonzentration und der in Gegenwart von Glas bestimmten Gleichgewichtskonzentration berechneten Adsorptionsisothermen sind in Abbildung 4-49 dargestellt<sup>1</sup>. Es ist hier deutlich zu erkennen, dass die adsorbierte Proteinmenge an Glasperlen mit ca. 10 mg/m<sup>2</sup> höher liegt als bei der Lagerung mit dem PPM Topas<sup>®</sup>.

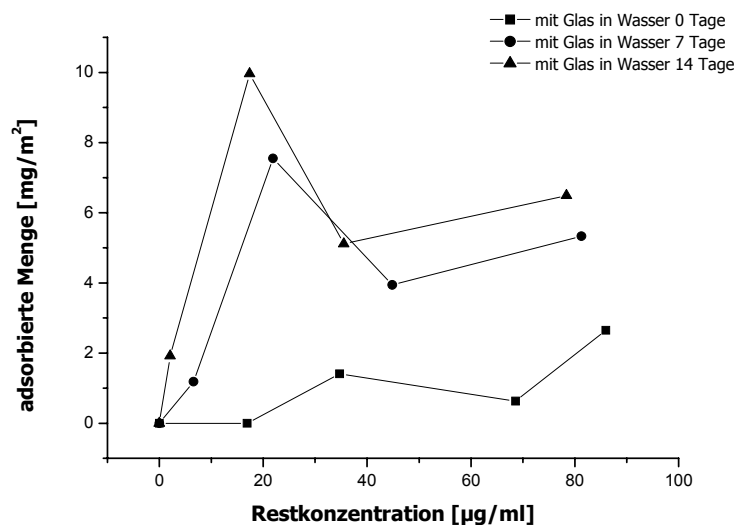


Abbildung 4-49: Adsorptionsisothermen der Bindung von Lysozym an Glasperlen bei Lagerung in Wasser (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

<sup>1</sup> Bei einer adsorbierten Menge von 10 mg/m<sup>2</sup> ergibt sich ein Konzentrationsverlust in der Lösung von ca. 38,5 µg/ml. Bei einer Präzision der Bestimmungsmethode muss somit mit einer Streuung der Differenzwerte von bis zu 12 % gerechnet werden, wodurch sich der atypische Verlauf der Kurven erklären lässt.

Abbildung 4-50 zeigt die Differenz der Helixanteile bei verschiedenen Proteinkonzentrationen in Wasser.

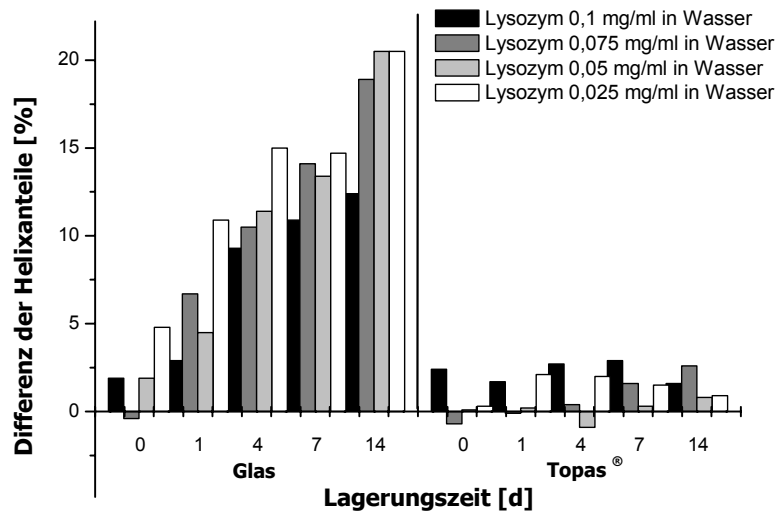


Abbildung 4-50: Differenz der Mittelwerte der Helixanteile verschiedener Lysozymkonzentrationen in rein wässriger Lösung mit Topas®- bzw. Glaszusatz (n=5).

Der Zusatz von Glas als PPM-Material bewirkt bei allen eingesetzten Konzentrationen eine deutliche Abnahme der Helixstruktur. Lysozym zeigt in einer Konzentration von 0,025 mg/ml bereits am 4. Tag nach der Herstellung bzw. der Lagerung einen Verlust an Helixstruktur von fast 15 %, der bis zum Ende des Versuchszeitraumes sogar auf 20 % ansteigt. Der Konformationsverlust der Probenlösung mit doppelter Lysozymkonzentration (0,05 mg/ml) beträgt nach 14 Tagen zwar auch ca. 20 %, jedoch wird dieser Verlust in den ersten Tagen der Probennahme noch weniger sichtbar als bei den Proben mit 0,025 mg/ml Lysozym.

Ein ähnliches Bild ist bei der Untersuchung von 0,075 mg/ml Lysozym in wässriger Lösung erkennbar. Auch hier ist während der Lagerung mit Glas ein kontinuierlicher Abfall an Sekundärstruktur zu beobachten. Der Gesamtverlust an  $\alpha$ -Helix beträgt ca. 18 %.

Ein Vergleich der Systeme mit 0,1 und 0,05 mg/ml Lysozym in Kombination mit Glas zeigt bereits in der ersten Woche einen größeren Verlust an Helixstruktur der niedriger konzentrierten Lösung, der sich im weiteren Verlauf der Lagerung immer deutlicher abzeichnet. Bei einer Proteinkonzentration von 0,05 mg/ml steigt die Differenz des Helixanteils gegenüber der Lösung mit 0,1 mg/ml Lysozym nochmals stark an. Der Gesamtverlust an  $\alpha$ -Helix nach

Ende der Messung ist mit ca. 13 % bei der Lösung mit 0,1 mg/ml Lysozym mit Abstand am niedrigsten.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen für die Lagerung von Lysozym in Kombination mit Topas<sup>®</sup>, ist auf den ersten Blick bereits ein deutlicher Unterschied zu erkennen (siehe Abbildung 4-50). Topas<sup>®</sup> bewirkt kaum einen Konformationsverlust. Der maximale Sekundärstrukturverlust liegt hier bei allen Konzentrationen bei maximal 2,5 %.

Inwieweit sich die beobachteten Effekte bezüglich der Proteinadsorption und Änderung der Konformation auf die Aktivität unterschiedlich konzentrierter Lysozymb Lösungen in Gegenwart der beiden PPM auswirken, wird nachfolgend aufgezeigt. Abbildung 4-51 fasst diese Ergebnisse zusammen. Alle Lösungen, die ohne Zusatz gelagert werden, zeigen kaum Verluste an spezifischer Aktivität des untersuchten Enzyms. Alle Werte bleiben über einen Lagerungszeitraum von 14 Tagen annähernd konstant. Bei der Lysozymkonzentration 0,05 mg/ml allerdings besitzt die gemessene Fluoreszenz einen deutlich erhöhten Wert, der zwar gleich bleibend ist, aber 2,5 Mal höher liegt, als alle anderen untersuchten Lösungen.

Auch Topas<sup>®</sup> als Oberflächenmaterial zeigt bei allen Konzentrationen eine kaum veränderte spezifische Aktivität. Allerdings sind die gemessenen Werte immer ein wenig niedriger als bei den Lösungen ohne Zusatz.

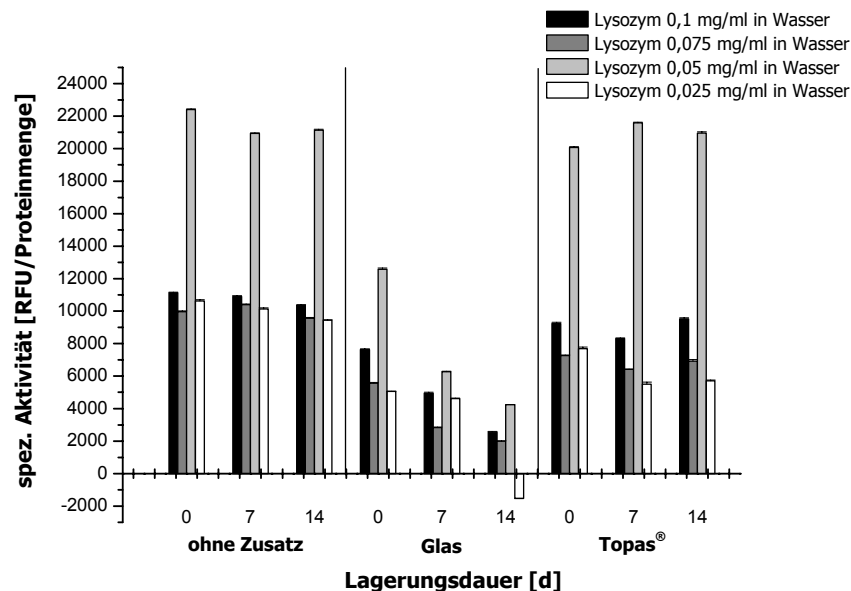


Abbildung 4-51: Spezifische Aktivität verschiedener Lysozymkonzentrationen in wässriger Lösung mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6).

Bei einer Lagerung in Gegenwart von Glas ist immer ein deutlicher Aktivitätsverlust der Lysozymlösung zu messen. Verglichen mit rein wässrigen Lösungen ohne Zusatz, ist schon zu Beginn der Herstellung (Tag 0) ein deutlicher Effekt zu erkennen. Lysozym hat in Kombination mit Glas gegenüber den Lösungen ohne Zusatz fast ein Viertel seiner spezifischen Aktivität verloren. Der Effekt ist bei der Lysozymlösung 0,05 mg/ml am deutlichsten ausgeprägt.

#### 4.2.3.2 Natriumchlorid 0,45 %

Wie bereits in Kapitel 4.2.1.5 beschrieben zeigt 0,45 % Natriumchlorid einen destabilisierenden Effekt auf das Lysozym. Aus diesem Grund werden Untersuchungen in diesem für das Enzym anscheinend sehr ungünstigen Milieu in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Abbildung 4-52 zeigt die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung unterschiedlicher Lysozymkonzentrationen in 0,45 % NaCl.

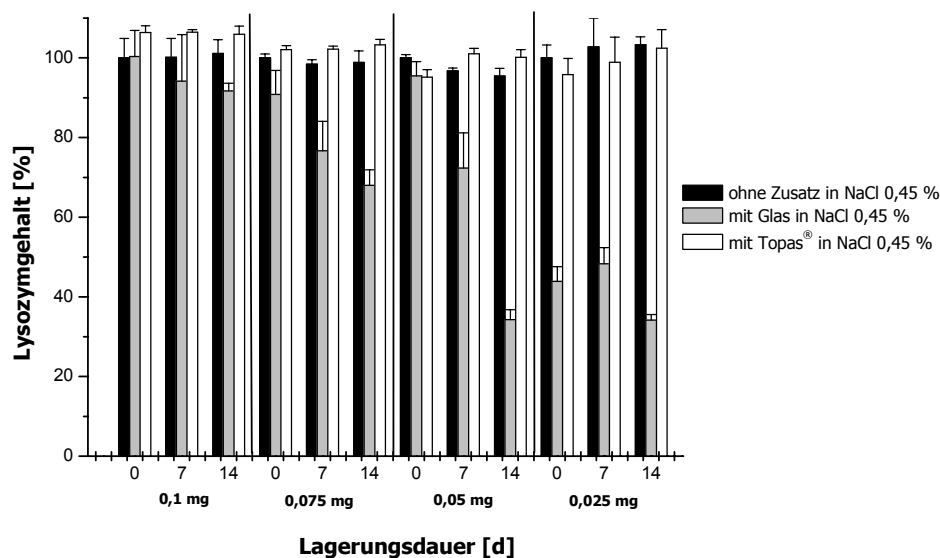


Abbildung 4-52: Bestimmung des Lysozymgehaltes (%) verschiedener Lysozymlösungen unterschiedlicher Konzentration in 0,45 % NaCl-Lösung mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

Grundsätzlich ist bei den reinen Enzymlösungen ohne PPM eine konstante Proteinkonzentration festzustellen.

Bei der Lagerung mit Topas® bleibt die Lysozymkonzentration unabhängig von der eingesetzten Menge nahezu konstant. Selbst bei der niedrigsten Proteinkonzentration (0,025 mg/ml) kann eine marginale und nicht signifikante Konzentrationsabnahme beobachtet werden, die bei Glaszusatz allerdings deutlich ausgeprägter ist.

Bei der Auswertung der Untersuchungen einer möglichen Veränderung der Lysozymkonzentration in NaCl 0,45 % kann festgehalten werden, dass auch hier wieder eine grundsätzliche Konzentrationsabnahme bei Glaskontakt zu erkennen ist. Dieser Effekt ist bei 0,1 mg/ml Lysozym aber sehr gering, was auch in Kapitel 4.2.1.5 bereits beschrieben wurde. Diese Tendenz wird ebenso bei der Lösung mit einer Konzentration von 0,075 und 0,05 mg/ml Lysozym festgestellt, bei der grundsätzlich eine Abnahme der Proteinkonzentration bei Glaszusatz erfolgt.

Die adsorbierten Lysozymmengen in Gegenwart von Glasperlen bzw. Topas®-Granulat sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Bei der Lagerung in Kombination mit Topas® zeigt Lysozym erstaunlicherweise bereits zu Beginn (Tag 0) die höchste Adsorption mit ca. 1 mg/m<sup>2</sup>. Im Verlauf der weiteren Lagerung ist eine Adsorption nicht mehr messbar. Bei der Lagerung mit Glasperlen hingegen erreicht die adsorbierte Lysozymmenge nach 14 Tagen ihr Maximum mit ca. 6 mg/m<sup>2</sup>.

Tabelle 4-2: Adsorptionsisothermen der Bindung von Lysozym an Topas® und Glasperlen bei Lagerung in 0,45 % NaCl (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

Topas®-Granulat					
Tag 0		Tag 7		Tag 14	
ads. Menge [mg/m <sup>2</sup> ]	Restkonz. [µg/ml]	ads. Menge [mg/m <sup>2</sup> ]	Restkonz. [µg/ml]	ads. Menge [mg/m <sup>2</sup> ]	Restkonz. [µg/ml]
0,6	26,87	0,16	27,73	0	28,73
0,98	37,48	0	39,78	0	39,43
0	70,5	0	70,59	0	71,32
0	90,5	0	90,54	0	90,11
Glasperlen					
4,06	12,3	3,95	13,55	5,01	9,58
0,46	37,6	2,48	28,5	6,22	13,5
1,64	62,67	3,89	52,94	5,51	46,97
0	85,34	1,32	80,11	2,07	77,99

In Abbildung 4-53 sind die Ergebnisse der Konformationsänderung von Lysozym in 0,45 % NaCl dargestellt. Auch in diesem Medium zeigt Lysozym das gleiche Verhalten wie bei der Lagerung in Wasser. Die Systeme, die weniger Protein enthalten, zeigen einen höheren Konformationsverlust des Enzyms in Kombination mit Glas nach zwei Wochen Lagerung. Grund-



sätzlich kann bei allen verwendeten Lösungen gesagt werden, dass bei Zusatz von Glas der Helixanteil des Proteins verringert wird.

Im Gegensatz zu Glas beeinflusst die Lagerung des Enzyms mit Topas® die Konformation des Proteins nur wenig. Der maximale Strukturverlust beträgt ca. 2 % und ist damit fast um den Faktor 10 geringer als bei Glas

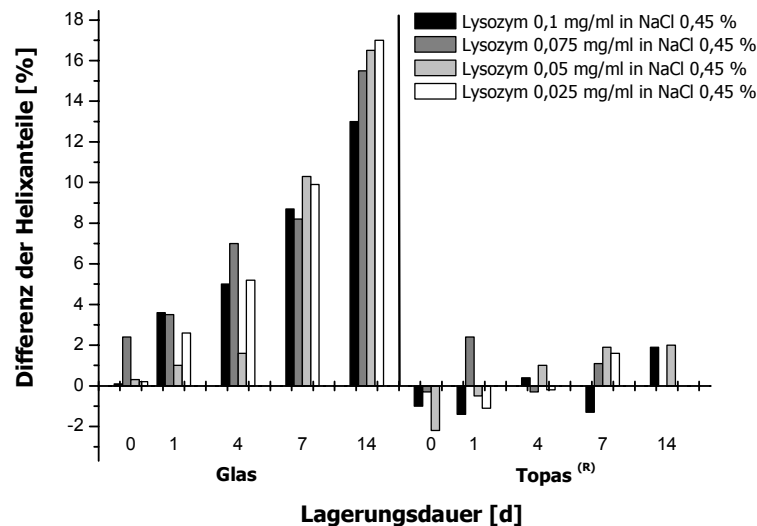


Abbildung 4-53: Differenz der Mittelwerte der Helixanteile verschiedener Lysozymkonzentrationen in NaCl-Lösung 0,45 % mit Topas®- bzw. Glaszusatz (n=5).

In Abbildung 4-54 ist der Einfluss der Lysozymkonzentration in 0,45 % NaCl auf die spezifische Aktivität dargestellt.

Die Lagerung in NaCl 0,45 % ergibt, dass in reinen Lösungen ohne jeglichen Zusatz eine gleichbleibende spezifische Aktivität des Lysozyms innerhalb der einzelnen Systeme gegeben ist, wobei diese mit sinkender Proteinkonzentration abnimmt. Lysozym 0,025 mg/ml besitzt die geringste katalytische Aktivität.

Topas® zeigt bei den beiden höher konzentrierten Lösungen gleich bleibende Werte, aber immer niedrigere als ohne PPM. Bei den beiden niedriger konzentrierten Lösungen ist auch bei dem Kunststoff eine verminderte Aktivität zu messen, wobei die spezifische Aktivität von Lysozym 0,025 mg/ml innerhalb von 14 Tagen zwar wieder leicht ansteigt, der Aktivitätsverlust im Vergleich zu dem am höchsten konzentrierten System (0,1 mg/ml) in Kombination mit Topas® jedoch ca. 36 % beträgt.

Mit Glas als Zusatz zeigt sich während der Lagerung auch in NaCl 0,45 % bei allen Konzentrationen ein starker Abfall der Aktivität, der auch bei Lysozym 0,025 mg/ml am deutlichsten

ausgeprägt ist. Hier sinkt die Aktivität scheinbar in den negativen Bereich ab. Erstaunlicherweise zeigt auch das System mit 0,075 mg/ml Lysozym einen starken Verlust an spezifischer Aktivität von 90 %.

Grundsätzlich zeigt die Lösung mit der geringsten Lysozymkonzentration (0,025 mg/ml) unabhängig von einem PPM-Zusatz die niedrigste spezifische Aktivität.

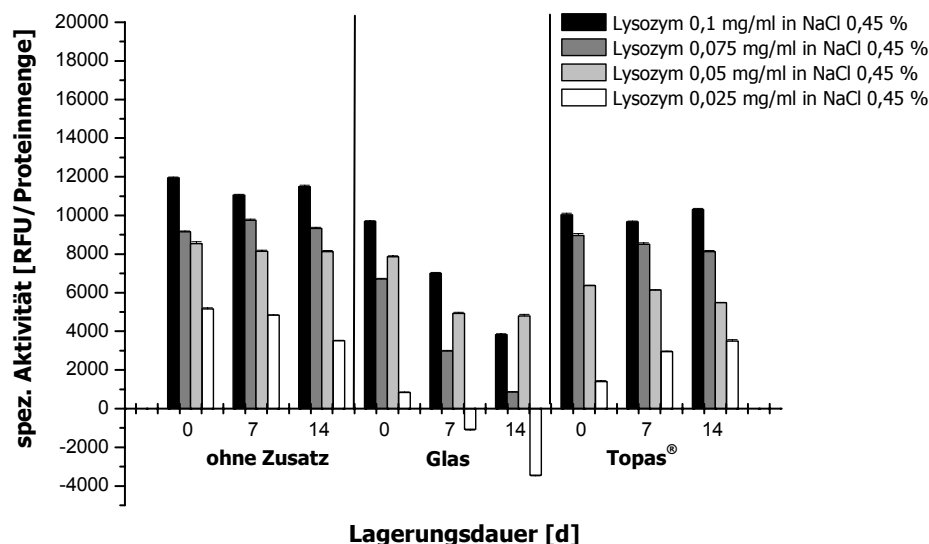


Abbildung 4-54: Spezifische Aktivität verschiedener Lysozymkonzentrationen in wässriger NaCl-Lösung 0,45 % mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6).

#### 4.2.3.3 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Einfluss der Proteinkonzentration

Die Adsorption von Proteinen an Fest-Flüssig-Grenzflächen lässt sich häufig mit einer Adsorptionsisotherme vom „high affinity“-Typ beschreiben [Rupprecht und Lee 1988]. Hierdurch wird unabhängig von der Ausgangskonzentration nahezu immer die selbe Menge Protein an die Feststoffoberfläche gebunden. Dabei nimmt der adsorbierte Anteil mit sinkender Proteinkonzentration in der Lösung überproportional zu; die Adsorption führt bei niedrigen Proteinkonzentrationen zu inakzeptabel hohen Wirkstoffverlusten.

Entsprechend den eigenen Untersuchungen und in Übereinstimmung mit Literaturdaten [Horbett 1992] adsorbiert Lysozym aus rein wässriger Lösung an Glas mit maximal 10 mg/m<sup>2</sup>. Demgegenüber beträgt die Adsorptionskapazität des Topas®-Granulates nur ein

Viertel. Aus Lösungen mit 0,45 % NaCl ist die Adsorption nochmals erniedrigt (Glas: < 6 mg/m<sup>2</sup>; Topas<sup>®</sup>: < 1 mg/m<sup>2</sup>).

Hieraus ergeben sich bereits deutliche Vorteile für das polyolefinische PPM-Material. Darüber hinaus kommt es während der Lagerung in Gegenwart von Topas<sup>®</sup> auch zu keinerlei Veränderungen hinsichtlich der Konformation und spezifischen Aktivität, was auf eine Indifferenz gegenüber Lysozym hindeuten lässt.

Im Gegensatz dazu wird Lysozym an die Glasoberfläche nicht nur in erheblich höherem Ausmaß gebunden, sondern es zeigen sich auch hier wieder starke Veränderungen in der Konformation, sowie eine Abnahme der Aktivität der Lysozymlösung. Dieses ist durch Adsorption und anschließende Desorption des Proteins erklärbar.

Die für Lysozymlösungen mit einer Ausgangskonzentration von 0,05 mg/ml in allen Systemen reproduzierbar gemessenen hohen Aktivitäten fallen vollständig aus dem Rahmen. Eine plausible Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden.

### 4.3 Anwendung der FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Konformation ausgewählter Systeme mit Lysozym

Ergänzend zu den CD-Messungen wird die Konformationsänderung mit Hilfe der Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie bestimmt. Modellhaft wird diese ergänzende Untersuchung mit Lysozym in NaCl 0,45 % durchgeführt, da Lysozym in dieser Lösung bei der Konformationsbestimmung mittels Circular dichroismus große Veränderungen gezeigt hat. Gelagert wird die Proteinlösung jeweils mit und ohne Glas und Topas<sup>®</sup>, in Type I plus<sup>®</sup>-Glas mit und ohne Silikonisierung, in Typ I-Glas und unsilikonisiertem Topas<sup>®</sup>. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 4-55 dargestellt.

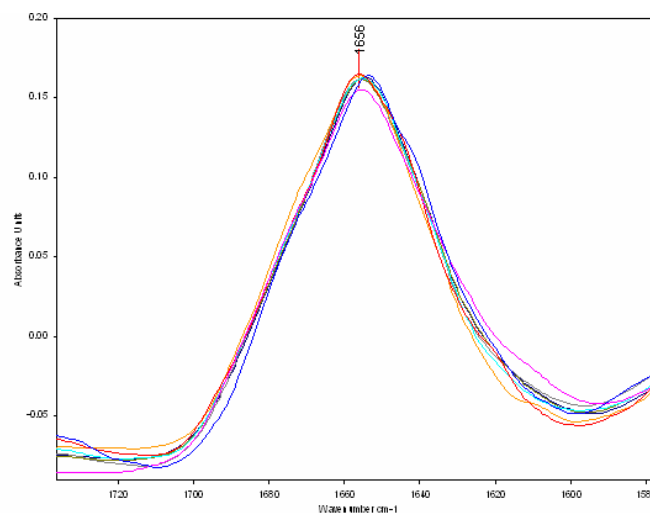


Abbildung 4-55: FTIR-Spektrum von Lysozym 0,1 mg/ml in NaCl 0,45 %. Alle Spektren sind im gezeigten Bereich Vektor normiert [Bruker Optics].

Bei der Betrachtung des FTIR-Spektrogrammes ist zu erkennen, dass keine der untersuchten Lösungen Unterschiede aufweist. Alle Spektren sind annähernd deckungsgleich und zeigen den gleichen Kurvenverlauf. Bei der Vermessung von Lysozym, das 14 Tage lang mit Glasperlen gelagert worden ist, ist keine Messung erfolgt, da das Protein ausgefallen und bereits visuell ein Niederschlag sichtbar gewesen ist, der in dem bereits beschriebenen System in Kapitel 4.2.1.5 nicht zu erkennen war. Möglich wäre eine Aggregation des Lysozyms durch die Aufarbeitung der Lösung für die FTIR-Messungen.

#### 4.3.1 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit der FTIR-Spektroskopie

Die Messungen der IR-Spektren von Lysozym in 0,45 % NaCl-Lösung mit verschiedenen Oberflächen bzw. PPM können trotz relativ geringen Konzentrationen erfolgreich durchgeführt werden. Bei einem Vergleich der gemessenen Spektren mit Spektren von nativem und denaturiertem Lysozym kann festgestellt werden, dass das Protein seine  $\alpha$ -helikale native Konformation in Kombination mit unterschiedlichen PPM beibehält. Es gibt keinerlei Anzeichen von  $\beta$ -Faltblatt, Denaturierung oder Aggregation. Kein Oberflächenmaterial zeigt hier Effekte auf die Konformation von Lysozym. Ein möglicher Grund kann in der Aufarbeitung der Proben für die IR-Methode liegen. Vielfach kann durch die Art der Probenaufbereitung eine Rückfaltung des Proteins erfolgen, die sich bei diesen Messungen auch ereignet haben kann (lt. Fa. Bruker).

Im Gegensatz zur circulardichrographischen Methode, bei der für die Lagerung von Lysozym in NaCl 0,45 % mit Glasperlen ein Sekundärstrukturverlust von fast 66 % bestimmt werden konnte, kann die gleiche Lösung (Probe 4: Lysozym gelagert mit Glas, 14 d nach Herstellung) mit Hilfe der IR-Spektroskopie nicht vermessen werden, da das Protein anscheinend ausgefallen ist. Da diese Reaktion das erste Mal stattgefunden hat, kann nicht beurteilt werden, ob es sich um eine Wechselwirkung zwischen Protein und Oberfläche handelt oder das Molekül aus anderen Gründen ausgefallen ist. Ob auch bei den Systemen, die mittels CD untersucht wurden, eine Aggregation des Lysozyms erfolgt ist und aus diesem Grund ein hoher Konformationsverlust resultiert, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da eine makroskopische Betrachtung der Lösung keinerlei Niederschlag erkennen ließ.

Bei der Lagerung des Lysozyms in den unterschiedlichen Gefäßen lässt sich mit FTIR keine Konformationsänderung nachweisen, obwohl mit CD eine Abnahme des Helixanteils ermittelt wird und auch eine Abnahme der spezifischen Aktivität gemessen werden kann. Auch in diesem Fall kann eine Rückfaltung des Proteins bei der Aufarbeitung Grund sein.

## 4.4 Untersuchung von rekombinantem Mistellektin (rML)

Aufbauend auf den Erkenntnissen, die mit Lysozym gewonnen wurden, werden in den folgenden Abschnitten die Resultate für rekombinantes Mistellektin diskutiert.

Wie die meisten Proteine zeigt auch das biotechnologisch hergestellte Mistellektin bei der Herstellung, Aufarbeitung und Lagerung starke Adsorptionseffekte, die eine präzise Wirkstoffdosierung erschweren [Gloger 2002, Witthohn 1996]. Um Aussagen über das Ausmaß und die Art der Veränderungen machen zu können, werden Konformations- und Aktivitätsuntersuchungen des rekombinanten Mistellektins durchgeführt. Mit Hilfe des ELLA kann eine Aktivitäts- und Konzentrationsbestimmung gemacht werden, denn nur korrekt gefaltetes, in seiner dimeren Form bestehendes Mistellektin kann mit dieser Testmethode erfasst werden.

### 4.4.1 Untersuchung der Konformationsänderung des rML

Bei der Untersuchung der Konformationsänderung von rekombinantem Mistellektin wird das Protein in fünf Gefäßen mit verschiedenen Oberflächenmaterialien gelagert. Der Einfluss der Oberfläche und der Proteinkonzentration auf eine mögliche Veränderung der Sekundärstruktur wird im Folgenden beschrieben.

#### 4.4.1.1 Einfluss der Oberfläche und der Konzentration

Das rekombinante Mistellektin wird in drei verschiedenen Konzentrationen (5, 25 und 50 µg/ml) und fünf unterschiedlichen Behältnissen untersucht. Da die Tendenz für alle drei untersuchten Konzentrationen ähnlich ist, wird in Abbildung 4-56 exemplarisch eine rML-Lösung 25 µg/ml in Diafiltrationspuffer dargestellt.

Die Vergleichslösung von rML in Diafiltrationspuffer, die in Polypropylengefäßen gelagert wurde, zeigt einen konstanten Helixanteil von ca. 30 %, was auf keine strukturellen Veränderungen des Proteins hindeutet.

Während zusätzlich silikonisiertes Type I plus® und Type I plus® eine abfallende Kurventendenz zeigen, weisen beide Topas®-Behältnisse allerdings einen nahezu geradlinigen Verlauf auf. rML zeigt bei der Lagerung in Typ I-Glas zwar eine anfängliche Abnahme der Sekundärstruktur, die aber im Verlauf der Lagerung wieder ansteigt und konstant verbleibt.

Der deutliche Abfall der Helixstruktur ein Tag nach der Abfüllung kann in allen Primärpackmitteln außer in Topas® festgestellt werden, was auf eine rasche Denaturierung an der PPM-Oberfläche schon zu Beginn der Lagerung schließen lässt. Die Standardabweichung ist bei diesem rekombinant hergestellten Protein grundsätzlich höher als bei dem bereits beschriebenen Lysozym.

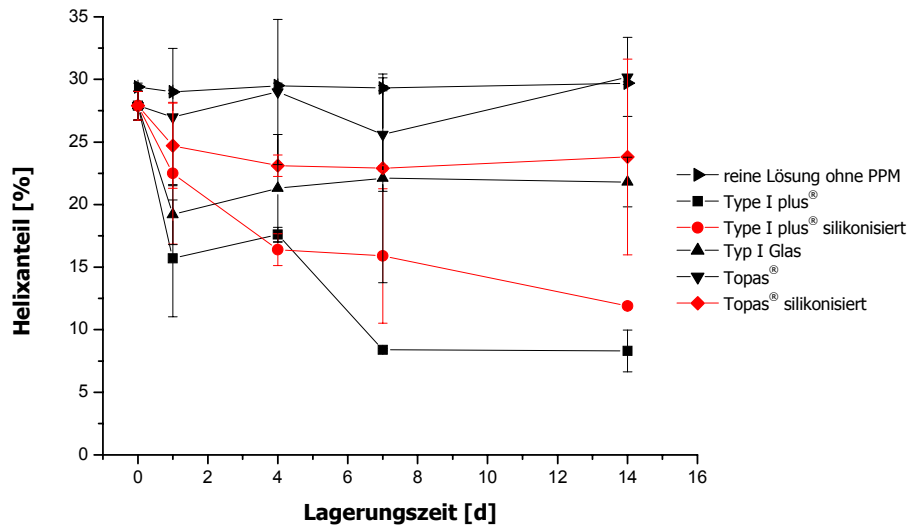


Abbildung 4-56: Helixanteil von rML (25 µg/ml) in Diafiltrationspuffer bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6). Als Vergleichslösung dient die reine Lösung bei Lagerung in Polypropylen (n=6).

#### 4.4.2 Aktivitäts- und Konzentrationsbestimmung von rML

Eine übliche analytische Methode die Menge an aktivem Mistellektin zu quantifizieren bzw. die Bindungseigenschaften der B-Kette zu untersuchen, ist der bereits in Kapitel 2.2.3 beschriebene ELLA. Denaturierte oder in ihrer Struktur veränderte rML-Moleküle können nicht erfasst werden. Beispielhaft für die drei untersuchten Konzentrationen werden die rML-Lösungen mit 5 und 25 µg/ml ausgewählt und die Ergebnisse in Abbildung 4-57 und 4-58 dargestellt.

Die Lagerung von rML in den verschiedenen PPM zeigt, dass bei beiden rML-Konzentrationen das PPM Type I plus® die höchste Proteinadsorption (ca. 40 %) nach 14 Tagen Lagerung zeigt und auch für silikonisiertes Type I plus® eine Abnahme der Proteinmenge bestimmt worden ist.

Der Kunststoff Topas® zeigt einen gleichbleibenden Gehalt an aktiver Substanz des rML während der gesamten Lagerung (siehe Abbildung 4-57 und 4-58).

Typ I-Glas zeigt wie auch die beiden Type I plus®-Gläser zu Beginn der Lagerung einen deutlichen Verlust an Aktivsubstanz. Nach 7 Tagen wird allerdings ein Plateauwert erreicht.

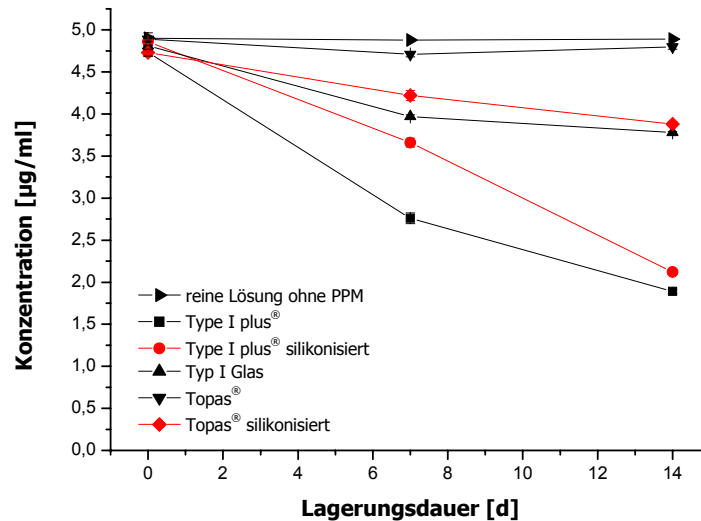


Abbildung 4-57: Bestimmung der rML-Konzentration nach Lagerung in unterschiedlichen Primärpackmitteln (n=3). Als Vergleichslösung dient die reine Lösung bei Lagerung in Polypropylen (n=3). Die Soll-Konzentration beträgt 5 µg/ml.

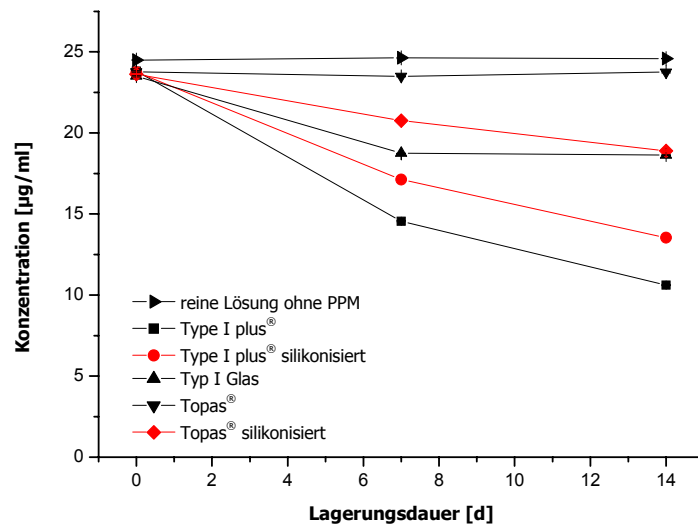


Abbildung 4-58: Bestimmung der rML-Konzentration nach Lagerung in unterschiedlichen Primärpackmitteln (n=3). Als Vergleichslösung dient die reine Lösung bei Lagerung in Polypropylen (n=3). Die Soll-Konzentration beträgt 25 µg/ml.



#### 4.4.2.1 Zusammenfassende Bewertung des Primärpackmitteleinflusses auf die Konformation und Aktivität von rML

Wird rML in kleinen Reaktionsgefäßen aus Polypropylen gelagert, so zeigt sich bei keiner der untersuchten Konzentrationen eine Veränderung des Proteins hinsichtlich der Konformation und Konzentration. Das Protein liegt während des gesamten Lagerungszeitraumes in aktiver Form vor.

Auch in Topas<sup>®</sup>-Gefäßen scheint es kaum Verluste durch Adsorptionseffekte zu geben. Nach einer zweiwöchigen Lagerung geht ein sehr geringer Proteinverlust mit einem konstanten Anteil an Helixstruktur einher, wobei die unsilikonisierten Kunststoffbehältnisse die günstigsten Ergebnisse liefern.

Am wenigsten geeignet für die Lagerung von rML-Lösungen erweisen sich Behältnisse aus Type I plus<sup>®</sup>-Glas. Eine fortschreitende Veränderung der Konformation während der Lagerung geht mit einer Konzentrationserniedrigung von fast 40 % einher, d.h. der Gehalt an aktivem rML sinkt auf 60 % ab. Dieses scheint in deutlichem Gegensatz zu nicht veröffentlichten Literaturdaten, die eine signifikant niedrigere Adsorptionstendenz für Type I plus<sup>®</sup>-Gläser beschreiben [Auchter-Krummel et al. 1997].

Der Unterschied in den eigenen Untersuchungen ist offensichtlich wiederum – in Analogie zum Verhalten des Lysozyms an der Glasoberfläche – darauf zurückzuführen, dass rML reversibel an die Oberfläche der Glasbehältnisse adsorbiert, dabei denaturiert und anschließend wieder desorbiert und in inaktiver Form in der Lösung erscheint. Möglicherweise hat die mit einer monomolekularen Quarzschicht versehene Glasoberfläche der Typ I plus<sup>®</sup> Behältnisse diesbezüglich ungünstigere Eigenschaften als konventionelles Typ I-Glas. Insgesamt ergibt sich damit folgende Reihenfolge der untersuchten PPM hinsichtlich ihrer Eignung für die Lagerung von rML-Lösungen:

Topas<sup>®</sup> > Topas<sup>®</sup> silikonisiert > Typ I Glas > Type I plus<sup>®</sup> silikonisiert > Type I plus<sup>®</sup>.

## 5 Abschlussdiskussion

Therapeutische Proteine sind labile Moleküle, die während der Lagerung auf vielfältige Weise ihre Aktivität einbüßen können. Besonders ausgeprägt finden diese Reaktionen bei der Lagerung von Proteinen in wässriger Lösungen statt. Neben dem chemischen Abbau und der Proteinaggregation sind insbesondere auch Wechselwirkungen mit dem Primärpackmittel zu bedenken, die zu einem Wirkverlust führen können. Im Vordergrund stehen hierbei adsorptive Wechselwirkungen an der Fest-Flüssig-Grenze. Diese führen zu einer Konzentrationsabnahme an Aktivsubstanz in der Lösung und damit zu einer Abnahme der spezifischen Aktivität der Proteinlösung. Typischerweise kann man hierbei von einer Belegungsdichte bei Ausbildung einer vollständigen Monoschicht von ca. 10 mg/m<sup>2</sup> ausgehen [Horbett 1992]. Dieses führt bei Behältnissen mit einem repräsentativen Volumen-Oberflächen-Verhältnis (10-ml-Vial mit 5 ml Füllvolumen) zu einer Konzentrationsabnahme von etwa 5 µg/ml. Eine qualitätsrelevante Gehaltsabnahme ist daher erst bei einer Proteinkonzentration von weniger als 100 µg/ml zu erwarten. Umgekehrt ist bei höher konzentrierten Proteinlösungen eine durch adsorptive Wechselwirkungen hervorgerufene Konzentrationsabnahme nicht qualitätsmindernd. Die eigenen Untersuchungen zum Verhalten von Lysozymlösungen (100 µg/ml) in Vials unterschiedlicher Materialien und Oberflächeneigenschaften (Type I plus<sup>®</sup>-Glas mit Silikonisierung, Type I plus<sup>®</sup>-Glas ohne Silikonisierung, Topas<sup>®</sup> mit Silikonisierung, Topas<sup>®</sup> ohne Silikonisierung, Typ I-Glas) bestätigen zunächst diese Überlegungen. Sie stehen allerdings im Gegensatz zu einer unveröffentlichten Studie der Fachhochschule Mannheim, die in Zusammenarbeit mit der Firma Schott entstand. Insbesondere der dort für Type I plus<sup>®</sup>-Glas beschriebene positive Einfluss konnte nicht bestätigt werden, da kaum nennenswerte Unterschiede im Adsorptionsverhalten des Modellproteins festzustellen waren. Offensichtlich lässt sich die Wechselwirkung eines Proteins mit der Oberfläche eines Primärpackmittels nicht in allen Fällen mit der einfachen Vorstellung einer irreversiblen Adsorption an der Fest-Flüssig-Grenzfläche beschreiben.

Zur differenzierteren Charakterisierung des Verhaltens eines Proteins an der Primärpackmiteloberfläche war es im Rahmen dieser Arbeit notwendig, eine geeignete Untersuchungsstrategie zu entwickeln. Diese beruht insbesondere darauf, dass verschiedene Untersuchungsmethoden kombiniert werden, um zwischen reversiblen und irreversiblen Adsorptionsprozessen zu unterscheiden. Dieses ist vor allem dann wichtig, wenn eine reversible Adsorption zusammen mit einer Konformationsänderung auftritt und damit zu einem Aktivitätsverlust des Proteins führt. Folgende Untersuchungsmethoden wurden eingesetzt: Das Ausmaß der Proteinadsorption wurde durch eine unspezifische Bestimmung der gelösten Proteinmenge mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt. Konformationsänderungen des Proteins wurden

durch Messen des Circular dichroismus erfasst. Durch Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde schließlich die Funktionalität des Proteins überprüft. Darüber hinaus wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen der Einfluss des Primärpackmittels dadurch gesteigert, dass Glasperlen bzw. Topas<sup>®</sup>-Granulat zugesetzt wurden, um das Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu vergrößern. Grundsätzlich ist es vorstellbar, dass im Rahmen von Screening-Untersuchungen jedes interessierende Primärpackmittel in granulierter Form zu den entsprechenden Proteinlösungen zugesetzt wird, um kurzfristig zu differenzierten Aussagen zu kommen.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurden drei Aspekte näher betrachtet.

## **5.1 Einfluss der Proteinkonzentration**

Die Adsorption von Proteinen an der Fest-Flüssig-Grenzfläche lässt sich häufig mit einer „high-affinity“-Adsorptionsisotherme beschreiben. Bereits bei niedrigen Gleichgewichtskonzentrationen findet man daher eine fast vollständige Oberflächenbelegung. Dieses führt erwartungsgemäß dazu, dass mit sinkender Proteinkonzentration der adsorptiv gebundene Anteil steigt. Unabhängig davon, ob die Bindung nun reversibel oder irreversibel ist, führt dieser Effekt zu einem nicht tolerablen Wirkverlust bei niedrig konzentrierten Proteinlösungen. In den eigenen Untersuchungen tritt die Abnahme der spezifischen Aktivität unabhängig vom verwendeten Primärpackmittel auf und unterscheidet sich auch im Ausmaß nicht gravierend.

Müssen niedrig konzentrierte Proteinlösungen eingesetzt werden, so bieten sich folgende zwei Strategien zur Problemlösung an: Zum einen besteht die Möglichkeit ein Primärpackmittel auszuwählen, das eine geringe Bindungstendenz aufweist. D. h., die Dichte der Bindungsstellen muss entsprechend niedrig sein, um Adsorptionsverluste gering zu halten. Dieses Konzept wird bei Type I plus<sup>®</sup>-Glas verfolgt. Alternativ ist der Zusatz von Hilfsstoffen denkbar, die bevorzugt an die Oberfläche des Primärpackmittels gebunden werden. Hierbei sind grenzflächenaktive Stoffe zu bevorzugen, die eine hohe Belegungsdichte sowie eine möglichst irreversible Adsorption zeigen. Gleichzeitig muss jedoch sichergestellt werden, dass der verwendete Hilfsstoff nicht die Adsorption des Proteins im Sinne einer Co-Sorption vermittelt.

## **5.2 Milieubedingungen**

In Abhängigkeit von den Milieubedingungen (pH-Wert, Ionenstärke) kann sich die Proteinstruktur ändern. Gleichzeitig wirken sich pH-Wert und Ionenstärke bei hydrophilen Oberflächen, wie z.B. Glasoberflächen, auf deren Ladungsdichte und Zetapotential aus. Nach Stu-

dien von Arai und Norde (1990) folgt daraus für Proteine mit vergleichsweise starrer Struktur, dass sie an hydrophile Oberflächen entsprechend dem Ausmaß der elektrostatischen Wechselwirkungen adsorbieren. Die eigenen Ergebnisse sind damit in guter Übereinstimmung und bestätigen für Lysozym eine komplexe Abhängigkeit der Wechselwirkung zwischen Protein und Feststoffoberfläche von den Milieubedingungen. Verallgemeinernd ergibt sich somit meist ein Protein-individuelles Stabilitätsoptimum, wobei Vorhersagen extrem kritisch sind. Bei hochkonzentrierten Proteinlösungen bietet sich so eine Optimierungsstrategie, die darauf abzielt, die Milieubedingungen so einzustellen, dass Adsorptionswechselwirkungen minimiert werden. Dieses ist jedoch nur von Belang, wenn bei reversibler Adsorption diese nicht mit einer Denaturierung einhergeht.

Gänzlich anders stellt sich die Situation dar, wenn Topas<sup>®</sup> als Primärpackmittel für Lysozym-lösungen eingesetzt wird. Im Gegensatz zu hydrophilen Oberflächen werden Proteine an hydrophobe Oberflächen unabhängig von den Milieubedingungen adsorbiert [Arai und Norde 1990]. Die eigenen Untersuchungen lassen darüber hinaus den Schluss zu, dass die Adsorption an die Oberfläche des zyklischen Olefin-Copolymers Topas<sup>®</sup> irreversibel erfolgt. Diese Hypothese konnte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen untermauert werden (siehe Abbildung 5-1).

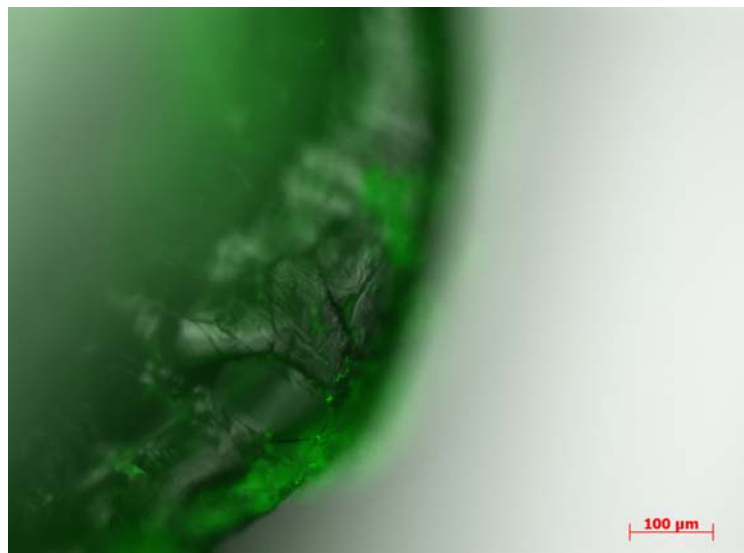


Abbildung 5-1: Fluoreszenzaufnahme von Topas<sup>®</sup>-Granulat mit fluoreszenzmarkiertem Lysozym Chromeon 494 ( $\lambda_{em} = 494 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex} = 633 \text{ nm}$ ). Nach 1 h Inkubation von 0,5 % Lysozymlösung und Topas<sup>®</sup>-Granulat wird zweimal mit Wasser gewaschen. Die Aufnahme erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop Carl Zeiss Axio Vision LE (D-Jena) mit einer Belichtung von 50 %.

In einem solchen Fall muss bei hochkonzentrierten Proteinlösungen keine Rücksicht auf die Wechselwirkung mit dem Primärpackmittel genommen werden. Bei der Formulierungsentwicklung kann ausschließlich auf die Optimierung der Stabilität der Proteinlösung geachtet werden.

### 5.3 Grenzflächenaktive Hilfsstoffe

Der Zusatz grenzflächenaktiver Hilfsstoffe zu Proteinlösungen, um Wirkstoffverluste durch Adsorptionseffekte zu vermeiden, ist in der Praxis Routine. Häufig werden Polysorbate und humanes Serumalbumin (HSA) als Hilfsstoffe verwendet. Der Einsatz dieser Substanzen geht von der Vorstellung aus, dass sie bevorzugt an Feststoffoberflächen adsorbieren, weil sie im Vergleich zum aktiven Protein eine höhere Grenzflächenaktivität aufweisen und/oder in höherer Konzentration eingesetzt werden. Insbesondere für Tenside ist in der Literatur mehrfach beschrieben, dass sie Proteine aus einer bereits bestehenden Bindung an die Feststoffoberfläche verdrängen können. Dieser Ansatz sollte dann zu einer Problemlösung beitragen, wenn die Bindung an die Feststoffoberfläche ausschließlich zu einer Konzentrationsabnahme in der Lösung führt. Ist die Adsorption des therapeutischen Proteins von einer Denaturierung begleitet, so kann der Zusatz grenzflächenaktiver Hilfsstoffe von Vorteil sein, wenn die Adsorption irreversibel verläuft und durch den Hilfsstoff das Ausmaß der Adsorption zurückgedrängt werden kann. Kaum Vorteile sind zu erwarten, wenn die Adsorption mit einer Denaturierung einhergeht und reversibel ist. Demzufolge zeigen die eigenen Untersuchungen, dass in Gegenwart von Glas, an das die Adsorption reversibel verläuft, eine fortschreitende Denaturierung des Lysozyms durch den Zusatz der grenzflächenaktiven Hilfsstoffe nicht verhindert werden kann. Lediglich sehr hohe Konzentrationen an Polysorbat können den Prozess der Denaturierung verlangsamen. Die Ergebnisse stehen somit in Einklang mit der Hypothese, dass der Aktivitätsverlust der Lysozymlösung in Gegenwart von Glas primär nicht auf eine adsorptive Bindung zurückzuführen ist, sondern auf eine reversible Adsorption, die mit einer Konformationsänderung einhergeht. Die Adsorption des Lysozyms an das hydrophobe Primärpackmittel Topas<sup>®</sup> ist ohne Hilfsstoffzusatz irreversibel. Dieses Verhalten verändert sich auch in Gegenwart von Poloxamer und PVP nicht. Das deutlich stärker grenzflächenaktive Polysorbat ist jedoch in der Lage, Lysozym aus seiner Bindung an die Topas<sup>®</sup>-Oberfläche zu lösen. Da nach Lu et al. (1998) die Bindung von Lysozym an hydrophobe Oberflächen mit einer Denaturierung einhergeht, wird nun inaktives Lysozym in die Lösung überführt. Da die Bindung von weiterem Lysozym an die Topas<sup>®</sup>-Oberfläche nicht vollständig unterbunden wird, schreitet dieser Effekt im Laufe der Lagerung fort. Dadurch kommt es entgegen den Erwartungen in Gegenwart des grenzflächenaktiven Hilfsstoffes zu einer Destabilisierung der Proteinlösung.

Von einem unkritischen Einsatz grenzflächenaktiver Hilfsstoffe zur Vermeidung von Adsorptionsverlusten ist demnach abzuraten. Insbesondere bei höher konzentrierten Proteinlösungen kann er sogar kontraproduktiv sein, wenn die Interaktion mit der Feststoffoberfläche mit einer Konformationsänderung und Inaktivierung des Proteins einhergeht.

## 5.4 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Interaktionen mit dem Primärpackmittel auch bei höher konzentrierten Proteinlösungen zu Aktivitätsverlusten führen können. Hierbei spielt die Konzentrationsabnahme aufgrund einer adsorptiven Bindung eine untergeordnete Rolle. Bedeutsamer sind hier reversible Adsorptionsvorgänge, die mit einer Denaturierung des therapeutischen Proteins einhergehen. Solch ein Verhalten wird durch die Hydrophilie der Oberfläche des Primärpackmittels begünstigt. Für höher konzentrierte Proteinlösungen stellen daher Primärpackmittel mit hydrophober Oberfläche eine günstigere Alternative dar. Der in dieser Arbeit im Vergleich zu Glas untersuchte innovative Spezialkunststoff Topas<sup>®</sup> weist solche Eigenschaften auf. Daraus resultiert offenbar auch eine Überlegenheit gegenüber dem mit einer Quarzoberfläche versehenen Type I plus<sup>®</sup>-Glas.

Aufgrund der strukturellen Vielfalt therapeutischer Proteine erscheint eine generelle Vorhersage der Wechselwirkung mit Primärpackmitteln allerdings sehr problematisch. Wie aus eigenen Untersuchungen mit rekombinantem Mistellektin festgestellt werden konnte, sind die mit Lysozym erhaltenen Ergebnisse nicht grundlegend übertragbar. Daher ist es im Einzelfall empfehlenswert, eine der hier vorgeschlagenen Untersuchungsstrategie vergleichbare Vorgehensweise anzuwenden. Diese muss zum Ziel haben, dahingehend eine klare Aussage treffen zu können, ob die Bindung an die Oberfläche des Primärpackmittels reversibel oder irreversibel ist, und ob durch die Bindung eine Denaturierung des Proteins eintritt.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Mechanismen, die zu einem Aktivitätsverlust von Proteinlösungen bei deren Lagerung führen. Hierbei sollte insbesondere der Einfluss verschiedener Zusätze sowie der Oberflächeneigenschaften verschiedener Primärpackmittel charakterisiert werden. Als Modellprotein wurde hauptsächlich Lysozym eingesetzt, da dessen Labilität in der Literatur bereits beschrieben war. Die Materialien der verwendeten Primärpackmittel (PPM) waren Typ I-Glas, Type I plus<sup>®</sup> Glas bzw. der polyolefinische Kunststoff Topas<sup>®</sup>. Die verwendeten Behältnisse waren teilweise zusätzlich noch silikonisiert.

Um den Einfluss der PPM-Protein-Wechselwirkungen differenziert erfassen zu können, wurden verschiedene Untersuchungsmethoden eingesetzt: Das Ausmaß der Proteinadsorption wurde durch eine unspezifische Bestimmung der gelösten Proteinmenge mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt. Konformationsänderungen des Proteins wurden durch Messen des Circular dichroismus erfasst. Durch Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde schließlich die Funktionalität des Proteins überprüft. Ergänzend dazu wurden mit ausgewählten Systemen FTIR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt, um zu evaluieren, ob diese Methode als Alternative zur Verfolgung von Konformationsänderungen von Proteinen eingesetzt werden kann.

Erste Untersuchungen, bei denen Lysozymlösungen in Vials der verschiedenen PPM eingelagert wurden, ergaben kaum messbare Effekte während der zweiwöchigen Lagerung. Allerdings ergaben sich schwache Hinweise darauf, dass die Wechselwirkungen mit Glasoberflächen stärker ausgeprägt waren als mit der Kunststoffoberfläche.

Um mögliche Effekte zu verstärken, wurden Glasperlen und Topas<sup>®</sup>-Granulat mit definierter Oberfläche zu den Lysozymlösungen gegeben, so dass das Oberflächen-Volumen-Verhältnis vergrößert wurde.

Um eine breitere Aussage über die Lysozym-PPM-Wechselwirkung treffen zu können, wurde das Verhalten der Lysozymlösung bei unterschiedlichen Milieubedingungen und nach Zusatz verschiedener Hilfsstoffe untersucht. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

Die Adsorptionseffekte von Lysozym in rein wässriger Lösung an Glasperlen waren erst bei gering konzentrierten Proteinlösungen (0,05 und 0,025 mg/ml) zu erkennen. Bei höher konzentrierteren Lysozymlösungen (0,075 und 0,1 mg/ml) lieferten Konformations- und Aktivitätsveränderungen des Moleküls einen deutlichen Hinweis darauf. Lysozym zeigte in rein wässriger Lösung ein dynamisches Verhalten. Nach Adsorption und Denaturierung in der Grenzfläche muss eine Desorption des Enzyms in die Lösung erfolgt sein. Das Protein bindet

demnach reversibel an der Glasoberfläche und erfährt einen Konformationsverlust. Dieser Effekt war mit sinkender Proteinkonzentration stärker ausgeprägt.

Wurde das Enzym bei unterschiedlichen pH-Werten ohne PPM-Zusatz gelagert, stellte sich heraus, dass die Konformationsänderungen des Proteins umso höher waren, je weiter der pH-Wert der Lösung vom IEP entfernt war. Unabhängig vom pH-Wert der Lösung ist allerdings kein System geeignet gewesen, Adsorptionseffekte des Proteins an Glas zu unterbinden. Bei pH 7,4 war der stärkste Verlust an Protein festzustellen, der möglicherweise durch eine Ausfällung des Proteins mit Calcium-Ionen aus dem Glas begründet werden kann, obwohl keine Trübung der Lösung beobachtet werden konnte.

Bei der Lagerung von Lysozym in unterschiedlich konzentrierten Kochsalzlösungen konnte gezeigt werden, dass mit einer Abnahme der Natriumchloridkonzentration bei gleichbleibender Proteinkonzentration, eine deutliche Zunahme der Interaktion zwischen Glas und Lysozym zu erkennen war. Bei gleich bleibender Natriumchloridkonzentration (0,45 %) und unterschiedlich konzentrierten Lysozymb Lösungen wurde auch hier mit sinkender Enzymkonzentration eine steigende Adsorption gemessen. Konformations- und Aktivitätsänderungen des Protein deuteten auch in diesem Fall auf eine Denaturierung des Enzyms mit reversibler Bindung an Glas hin. Eine Ausnahme bildete das System mit physiologischer Kochsalzlösung, bei der das Protein trotz Glaszusatz keine nennenswerten Veränderungen in seiner Konzentration, Konformation und katalytischen Aktivität erfuhr.

Der Einsatz oberflächenaktiver Substanzen zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit: Je geringer die Konzentration an grenzflächenaktiver Substanz in Lösung war, desto stärker war auch die Proteinadsorption. Versuche mit Polysorbat 80 zeigten bei der höchsten Tensidkonzentration (0,1 %) die geringste Adsorption in Kombination mit Glas, der Zusatz von Topas® bewirkte allerdings eine verringerte Aktivität des Enzyms. PVP und Poloxamer 407 zeigten keinen positiven Einfluss auf eine Verringerung der Adsorption von Lysozym und sollten als Hilfsstoffe in Kombination mit Glas keine Verwendung finden.

Werden Lysozymb Lösungen in Gegenwart von Topas® als PPM gelagert, so können in Abhängigkeit von den Milieubedingungen geringfügige Adsorptionsverluste ermittelt werden. Die stärkste Adsorption ist aus Lösungen, die 0,025 mg/ml Lysozym in wässriger Lösung enthalten, zu beobachten. In fast allen anderen Systemen kommt es jedoch zu keinen nennenswerten Veränderungen der Proteinkonformation und der spezifischen Aktivität während der Lagerung. Dieses ist offensichtlich darauf zurückzuführen, dass Lysozym irreversibel an die Topas®-Oberfläche gebunden wird. Einen deutlichen Hinweis darauf konnte mit Hilfe fluores-



zenzmikroskopischer Aufnahmen nach Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Lysozym gewonnen werden. Der Zusatz höherer Konzentrationen Polysorbat 80 (0,1 %) vermittelt jedoch die Desorption und führt dann ebenfalls zu den in Gegenwart von Glas beobachteten Konformationsänderungen.

Ausgehend von dem Modellprotein Lysozym wurden Untersuchungen mit rekombinantem Mistellektin in PPM-Behältnissen durchgeführt. Während in Type I plus<sup>®</sup> Glas die höchste Konzentrationsabnahme sowie der stärkste Aktivitätsverlust verzeichnet wurde zeigen sich in Topas<sup>®</sup>-Behältnissen nur geringe strukturelle Veränderungen des Proteins.

Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen wurde auch eine mögliche Verbesserung des sonst verwendeten Verfahrens zur Aktivitätsbestimmung (ELLA) hinsichtlich der Bindungsspezifität und der Selektivität für rML untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das üblicherweise verwendete Asialofetuin für die Spezifität und humanes Haptoglobin Phänotyp 1.1 für die Sensitivität des ELLA die geeigneten Beschichtungsmatrices darstellten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine allgemein gültige Aussage hinsichtlich der PPM-Protein-Wechselwirkung nicht getroffen werden kann, da bei jedem Protein in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen ein sehr unterschiedliches Verhalten zu erwarten ist. Die Arbeit gibt jedoch einen klaren Hinweis bezüglich der anzuwendenden Untersuchungsstrategie: Diese sollte, um eine mechanistische Differenzierung zu erlauben, eine unspezifische Proteinbestimmungsmethode, eine Methode zur Erfassung von Konformationsänderungen sowie ein Verfahren zur Bestimmung der spezifischen Aktivität umfassen, damit zwischen Adsorptionsphänomenen und anderen Instabilitäten differenziert werden kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine irreversible Bindung von Proteinwirkstoffen an die PPM-Oberfläche bei höher konzentrierten Lösungen günstiger sein kann als eine reversible Bindung, wenn diese zur Denaturierung führt. Des weiteren lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass der Einsatz grenzflächenaktiver Hilfsstoffe nur nach Kenntnis der Wechselwirkungsmechanismen gerechtfertigt ist und keinesfalls unkritisch erfolgen darf.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adler, A. J., N. J. Greenfield, G. D. Fasman,** Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides, in: Colowick S. P., Kaplan N. O. (Hrsg.), . Methods in Enzymology: Enzyme Structure (Part D), Academic Press New York (1973) 675-735
- Alberstetter, J., Roth, C.,** Doppelfunktion von Glas als Primärpackmittel und Injektionssystem, Pharm. Ind. 65 (9 a) (2003) 956-965
- Algner, S., Helbig, J., Spingler, E.,** Primär-Packmittel. Herstellung + Optimierung + Kontrolle = Sicherheit, Paperback APV Band 9, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1984)
- Andrade, J. D.,** Protein Adsorption. Surface and interfacial aspects of biomedical polymers, Band 2, Plenum Publishing Corporation New York (1986)
- Anfinsen, C. B.,** Principles that govern the folding of protein chains, Science 181 (96) (1973) 223-230
- Arai, T., Norde, W.,** The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces. 1. Adsorption from single protein solutions, Colloids Surf. 51 (1990) 1-15
- Arnebrant, T., Wahlgren M. C.,** Protein-surfactant interactions at solid surfaces, in: Horbett, T.A., Brash, J.L. (Hrsg.), Proteins at interfaces II: Fundamentals and applications, American Chemical Society Washington D.C. (1995) 239-254
- Auchter-Krummel, P., Spallek, M., Walther, M., Schrattenholz, A.,** Investigation of protein adsorption properties of vials with modified surfaces from the RPA-test kit (SCHOTT), unveröffentlichte Studie (1997)
- Bauer, K. H., Frömming, K.-H., Führer, C.,** Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 7. Auflage (2002)
- Beuth, J., Ko, H. L., Tunggal, Geisel, J. Pulverer, G.,** Vergleichende Untersuchungen zur immunaktiven Wirkung von Galaktosid-spezifischem Mistellektin. Reinsubstanz gegen standardisierten Extrakt, Arzneimittelforschung 43 (2) (1993) 166-169
- Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., Sarma, V. R.,** Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution, Nature 206 (986) (1965) 757-761
- Bradford, M. M.,** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254
- Brash, J. L.,** The fate of fibrinogen following adsorption at the blood-biomaterial interface, Ann. N. Y. Acad. Sci. 516 (1987) 206-222

- Brash, J. L.**, Studies of protein adsorption relevant to blood compatible materials, in: Missirlis, Y. F., Lemm, W. (Hrsg.), Modern aspects of protein adsorption on biomaterials, Kluwer Academic Publishers Boston (1991) 39-47
- Brash, J. L., Horbett, T. A.**, Proteins at interfaces - An overview, in: Horbett, T. A., Brash, J. L. (Hrsg.), Proteins at interfaces II: Fundamentals and applications, American Chemical Society Washington D.C. 1995 1-23
- Brenda Enzymdatenbank**, Brenda - The comprehensive enzyme information system, Köln (2006)
- Burrin, D. H.**, Spektroskopische Verfahren, in: Wilson, K., Goulding, K. H., Methoden der Biochemie, Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage (1991) 335-390
- Buß, V.**, Chiralität, optische Aktivität und chiroptische Messverfahren, Pharm. Ztg. 4 (1995) 9-22
- Canfield, R. E.**, The amino acid sequence of egg white lysozyme, J. Biol. Chem. 238 (1963) 2698-2707
- Cheetham, J. C., Artymiuk, P. J., Phillips, D. C.**, Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy. Hen egg-white lysozyme and tri-N-Acetylchitotriose at 1.75 Å resolution, J. Mol. Biol. 224 (3) (1992) 613-628
- Chen, Y. H., Yang, J. T.**, A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism, Biochem. Biophys. Res. 44 (6) (1971) 1285-1291
- Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W., Carpenter, J. F.**, Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation, Pharm. Res. 20 (9) (2003) 1325-1336
- Cullen, D. C., Lowe, C. R.**, AFM studies of protein adsorption, J. Coll. Interf. Sci. 166 (1994) 102-108
- Dominik, A., Steinhilber, D.**, Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten, Jungjohann Verlag bei Gustav Fischer Ulm, 1. Auflage (1996)
- Duncan, M. R., Lee, J. M., Warchol, M.P.**, Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene, Int. J. Pharm. 120 (1995) 179-188
- Eck, J., Langer, M., Mockel, B., Baur, A., Rothe, M., Zinke, H., Lentzen, H.**, Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain, Eur. J. Biochem. 264 (3) (1999 a) 775-784
- Eck, J., Langer, M., Mockel, B., Witthohn, K., Zinke, H., Lentzen, H.**, Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains, Eur. J. Biochem. 265 (2) (1999 b) 788-797

- Endo, Y., Tsurugi, K., Franz, H.,** The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-Glycosidase activity of the protein, *FEBS Lett.* 231 (2) (1988) 378-380
- Eschenburg, S., Krauspenhaar, R., Mikhailov, A., Stoeva, S., Betzel, C., Voelter, W.,** Primary structure and molecular modeling of mistletoe lectin I from viscum album, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (2) (1998) 367-372
- Europäisches Arzneibuch,** 4. Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart und Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag Eschborn (2002)
- Europäisches Arzneibuch,** 5. Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart und Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag Eschborn (2005)
- Fang, F., Szleifer, I.,** Kinetics and thermodynamics of protein adsorption: A generalized molecular theoretical approach, *Biophys. J.* 80 (6) (2001) 2568-2589
- Fiedler, H. P.,** Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4. Auflage (1996)
- Fink, A. L., Calciano, L. J., Goto, Y., Kurotsu, T., Palleros, D. R.,** Classification of acid denaturation of proteins: Intermediates and unfolded states, *Biochemistry* 33 (41) (1994) 12504-12511
- Fischer, F.,** Folding of lysozyme, in: Jollés, P. (Hrsg.), *Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology*, Birkhäuser Verlag Basel (1996) 143-161
- Food and Drug Administration (FDA),** U.S. Department of Health and Human Services, <http://www.fda.gov/> (2006)
- Frantz, M., Jung, M. L., Ribereau-Gayon, G., Anton, R.,** Modulation of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins, *Arzneimittelforschung* 50 (5) (2000) 471-478
- Franz, H., Ziska, P., Kindt, A.,** Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.), *Biochem. J.* 195 (2) (1981) 481-484
- Franz, H.,** Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album* L.) als potentielle Arzneimittel, *Pharmazie* 40 (2) (1985) 97-104
- Franz, H.,** Mistletoe lectins and their A and B chains, *Oncology* 43 (1) (1986) 23-34
- Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E.,** Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution, *Biochemistry* 37 (28) (1998) 10223-10230
- Gloger, O.,** Stabilisierung von rekombinantem Mistellektin durch Gefriertrocknung, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel (2002)
- Goldberg, M. E.,** The second translation of the genetic message: Protein folding and assembly, *Trends Biochem. Sci.* 10 (1985) 388-391

- Gray, J. J.**, The Interaction of proteins with solid surfaces, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 (1) (2004) 110-115
- Gupta, D., Kaltner, H., Dong, X., Gabius, H. J., Brewer, C. F.**, Comparative cross-linking activities of lactose-specific plant and animal lectins and a natural lactose-binding immunoglobulin G fraction from human serum with asialofetuin, *Glycobiology* 6 (8) (1996) 843-49
- Guttzeit, Y.**, Volumenänderung bei der Faltung von HEW-Lysozym: Korrelation mit CD-spektroskopischen Daten und energetischen Parametern, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster (2002)
- Ha, E., Wang, W., and Wang, Y. J.**, Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability, *J. Pharm. Sci.* 91 (10) (2002) 2252-2264
- Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H. J.**, Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients, *Cancer Res.* 49 (17) (1989) 4803-4808
- Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C., Gabius, H. J.**, Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, Interleukin 1, and Interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract, *Cancer Res.* 50 (11) (1990) 3322-3326
- Hamaguchi, K., Ikeda, K.**, Applications of circular dichroic spectroscopy to the study of interaction between lysozyme and small molecules, *Annual report of biological works* 19 (1972) 1-29
- Haynes, C. A., Norde, W.**, Structures and stabilities of adsorbed proteins, *J. Coll. Interf. Sci.* 169 (1994) 313-328
- Hlady, V. V., Buijs, J.**, Protein adsorption on solid surfaces, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (1) (1996) 72-77
- Holtskog, R., Sandvig, K., Olsnes, S.**, Characterization of a toxic lectin in Iscador, a mistletoe preparation with alleged cancerostatic properties, *Oncology* 45 (3) (1988) 172-179
- Horbett, T. A.**, Adsorption of proteins and peptides at interfaces, in: Ahern, T. J., Manning, and M. C. (Hrsg.), *Stability of proteins pharmaceuticals Part A*, Plenum Press New York (1992) 195-214
- Hussein, F., Daniels, R.**, Improvement of an enzyme linked lectin assay to determine recombinant mistletoe lectin I, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 758-762
- Imoto, I.**, Engineering of lysozyme, in: Jollés, P. (Hrsg.), *Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology*, Birkhäuser Verlag Basel (1996) 163-181

- Jaenicke, L.**, Reproduzierbare Protein-Analytik mit Coomassie Brilliantblau, *Chemie in Labor und Biotechnik* 3 (1997) 90-91
- John, R. A.**, Photometric assays, in: Eienthal, R., Danson, M. J. (Hrsg.), *Enzyme assays. A practical approach*, Oxford University Press New York (1992) 86-92
- Jollés, P., Jollés, J.**, What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday, *Mol. Cell. Biochem.* 63 (2) (1984) 165-189
- Jollès, P.**, *Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology*, Birkhäuser Verlag Basel (1996)
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., Alakhov, V. Y.**, Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J. Control. Release* 82 (2002) 189-212
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J.**, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 14. Auflage (1994)
- Kawaguchi, H.**, Functional polymer microspheres, *Prog. Polym. Sci.* 25 (2000) 1171-1210
- Kelly, S. M., Jess, T. J., Price, N. C.**, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta* 1751 (2) (2005) 119-139
- Krauspenhaar, R., Eschenburg, S., Perbandt, M., Kornilov, V., Konareva, N., Mikailova, I., Stoeva, S., Wacker, R., Maier, T., Singh, T., Mikhailov, A., Voelter, W., Betzel, C.**, Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 (2) (1999) 418-424
- Kurosky, A., Barnett, D. R., Lee, T. H., Touchstone, B., Hay, R. E., Arnott, M. S., Bowman, B. H., Fitch, W. M.**, Covalent structure of human haptoglobin: A serine protease homolog, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (77) 6 (1980) 3388-3392
- Langer, M., Möckel, B., Eck, J., Zinke, H., Lentzen, H.**, Site-specific mutagenesis of mistletoe lectin: The role of RIP activity in apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (264) 3 (1999) 944-948
- Lee, R. T., Gabius, H. J., Lee, Y. C.**, Ligand binding characteristics of the major mistletoe lectin, *J. Biol. Chem.* 267 (33) (1992) 23722-23727
- Lee, R. T., Gabius, H. J., Lee, Y. C.**, The sugar-combining area of the galactose-specific toxic lectin of mistletoe extends beyond the terminal sugar residue: Comparison with a homologous toxic lectin, ricin, *Carbohydr. Res.* 254 (1994) 269-276
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M.**, *Lehninger Biochemie*, Springer-Verlag Berlin, 3. Auflage (2001)
- Lu, C. F., Nadarajah, A., Chittur, K. K.**, A comprehensive model of multiprotein adsorption on surfaces, *J. Coll. Interf. Sci.* 168 (1994) 152-161

- Lu, J. R., Su, T. J., Thirtle, P. N., Thomas, R., K., Rennie, A. R., Cubitt, R.,** The denaturation of lysozyme layers adsorbed at the hydrophobic solid/liquid surface studied by neutron reflection, *J. Coll. Interf. Sci.* 206 (1) (1998) 212-223
- Lucarini, A.C., Kilikian, B.V.,** Comparative study of lowry and Bradford methods: Interfering substances, *Biotechnol. Tech.* 13 (1999) 149-154
- Manning, M. C., Patel, K. , Borchardt, R. T.,** Stability of protein pharmaceuticals, *Pharm. Res.* 6 (11) (1989) 903-918
- Martin, A. N.,** *Physikalische Pharmazie*, Hrsg. Leuenberger, H., Basel, 4. Auflage (2002)
- McCoy, J. P., Jr., Varani, J. Goldstein, I. J.,** Enzyme-linked lectin assay (ELLA). II. Detection of carbohydrate groups on the surface of unfixed cells, *Exp. Cell Res.* 151 (1) (1984) 96-103
- Mengs, U., Gothel, D., Leng-Peschlow, E.,** Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: Review on current status of preclinical research, *Anticancer Res.* 22 (3) (2002) 1399-1407
- Mirsky, A. E., Pauling, L.,** On the structure of native, denatured, and coagulated proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 22 (7) (1936) 439-447
- Morrissey, B.W.,** Adsorption and conformation of proteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 283 (1977) 50-64
- Müthing, J., Burg, M., Mockel, B., Langer, M., Metelmann-Strupat, W., Werner, A., Neumann, U., Peter-Katalinic, J., Eck, J.,** Preferential binding of the anticancer drug rviscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally alpha2-6-sialylated neolacto-series gangliosides, *Glycobiology* 12 (8) (2002) 485-497
- Müthing, J., Meisen, I., Bulau, P., Langer, M., Witthohn, K., Lentzen, H., Neumann, U., Peter-Katalinic, J.,** Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Acalpha2-6Galβ1-4GlcNAc residues, *Biochemistry* 43 (2004) 2996-3007
- Müthing, J., Meisen, I., Kniep, B., Haier, J., Senninger, N., Neumann, U., Langer, M., Witthohn, K., Milosevic, J., Peter-Katalinic, J.,** Tumor-associated CD75s gangliosides and CD75s-bearing glycoproteins with Neu5Acalpha2-6Galbeta1-4GlcNAc-residues are receptors for the anticancer drug rviscumin, *FASEB J.* 19 (1) (2005) 103-105
- Myer, Y. P.,** A new method for the conformational analysis of proteins and polypeptides from circular dichroism spectra, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1 (5) (1970) 607-616
- Nadarajah, A., Lu, C.F., Chittur, K. K.,** Modeling the dynamics of protein adsorption to surfaces, in: Horbett, T.A., Brash, J.L. (Hrsg.), *Proteins at interfaces II: Fundamentals and applications*, American Chemical Society Washington D.C. (1995) 181-193

- Nakanishi, K., Sakiyama, T., Imamura, K.,** On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon, *J. Biosci. Bioeng.* 91 (3) (2001) 233-244
- Niwa, H., Tonevitsky, A. G., Agapov, I. I., Seward, S., Pfüller, U., Palmer, R. A.,** Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-I ribosome-inactivating protein, complexed with galactose, *Eur. J. Biochem.* 270 (13) (2003) 2739-2749
- Norde, W.,** Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface, *Adv. Colloid Interface Sci.* 25 (4) (1986) 267-340
- Norde, W., Haynes, C. A.,** Globular proteins at solid/liquid interfaces, *Colloids Surfaces B* 2 (6) (1994) 517-566
- Norde, W., Haynes, C. A.,** Reversibility and the mechanism of protein adsorption. in: Horbett, T.A., Brash, J.L. (Hrsg.), *Proteins at interfaces II: Fundamentals and applications*, American Chemical Society Washington D.C. (1995) 26-39
- Pauling, L., Corey, R. B.,** Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: Two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37 (11) (1951 a) 729-740
- Pauling, L., Corey, R. B., Branson, H. R.,** The structure of proteins; Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37 (4) (1951 b) 205-211
- Peters, A.,** Chemische Veränderungen an der Oberfläche des Glases, in: Jebsen-Marwedel, H., Brückner, R. (Hrsg.), *Glastechnische Fabrikationsfehler*, Springer-Verlag Berlin (1980) 482-487
- Peters, A.,** Glas-Ein Primärpackmittel für pharmazeutische Produkte, in: Helbig, J., Spingler, E., *Kunststoffe für die Pharmazeutische Verpackung*, Paperback APV Band 13, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1985) 56-69
- Pfaender, H. G.,** Schott-Glaslexikon, mvg-Verlag Landsberg am Lech, 5. überarbeitete Auflage (1997)
- Phillips, D. C.,** The hen egg-white lysozyme molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57 (3) (1967) 484-495
- Pistorius, A. M. A.,** Biochemical applications of FT-IR spectroscopy, *Spectroscopy Europe* 7 (4) (1995) 8-15
- Rostock, M.,** Misteltherapie: Ihr aktueller Stellenwert bei der Behandlung von Tumorerkrankungen, in: Rietbrock, N. (Hrsg.), *Phytopharmaka VI: Forschung und klinische Anwendung*, Steinkopff Verlag Darmstadt (1996) 167-180
- Rote Liste 2006,** Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt/Main (2006)



- Rupley, J. A., Butler, L., Gerring, M., Hartdegen, F. J., Pecoraro, R.**, Studies on the enzymic activity of lysozyme, II. The hydrolysis and transfer reactions of N-Acetylglucosamine oligosaccharides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57 (3) (1967) 496-510
- Rupprecht, H., Lee, G.**, Adsorption at solid surfaces, in: Swarbrick, J., Boylan, J. C. (Hrsg.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker Inc. New York (1988) 73-114
- Schöffski, P., Riggert, S., Fumoleau, P., Campone, M., Bolte, O., Marreaud, S., Lacombe, D., Baron, B., Herold, M., Zwierzina, H., Wilhelm-Ogunbiyi, K., Lentzen, H., Twelves, C.**, Phase I trial of intravenous aiscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: A study of the european organization for research and treatment of cancer new drug development group, *Ann. Oncol.* 15 (12) (2004) 1816-1824
- Schott forma vitrum**, Schott TopPac-Superior performance made of polymer, [http://www.schott.com/pharmaceutical\\_packaging/english/download/toppac2.pdf#search=%22schott%20topas%22](http://www.schott.com/pharmaceutical_packaging/english/download/toppac2.pdf#search=%22schott%20topas%22) 2006
- Schreier, P., Bernreuther, A. Huffer, M.**, Analysis of chiral organic molecules, Walter de Gruyter Verlag Berlin (1995)
- Schumacher, K., Winter, G., Mahler, H.-C.**, Instabilitäten von Proteinarzneimitteln, *PZ Prisma* 1 (2003) 15-18
- Schwalbe, H., Grimshaw, S. B., Spencer, A., Buck, M., Boyd, J., Dobson, C. M., Redfield, C., Smith, L. J.**, A refined solution structure of hen lysozyme determined using residual dipolar coupling data, *Protein Sci.* 10 (4) (2001) 677-688
- Sela, M., White, F. H., Jr., Anfinsen, C. B.**, Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease, *Science* 125 (3250) (1957) 691-692
- Snatzke, G.**, Chiroptische Methoden in der Stereochemie Teil I, *Chemie in unserer Zeit* 3 (1981) 78-87
- Snatzke, G.**, Circular dichroism: An introduction, in: Nakanishi, K., Berova, N., Woody, R. W. (Hrsg.), *Circular dichroism. Principles and applications*, VCH Publishers, Inc. New York (1994) 1-38
- Soderquist, M.E., Walton, A.G.**, Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces, *J. Coll. Interf. Sci.* 75 (1980) 386-392
- Stirpe, Fiorenzo, Barbieri, L., Battelli, M. G., Soria, M., Lappi, D. A.**, Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and future prospects, *Bio/Technology* 10 (1992) 405-412
- Stryer, L.**, Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft Heidelberg, 3. Auflage (1990)

- Strynadka, N. C. J., James, M.N.G.**, Lysozyme: A model enzyme in protein crystallography, in: Jollés, P. (Hrsg.), *Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology*, Birkhäuser Verlag Basel (1996) 185-222
- Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., Chapman, D.**, Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment, *Biochemistry* 32 (2) (1993) 389-394
- Tanaka, F., Forster, L. S., Pal, P. K., Rupley, J. A.**, The circular dichroism of lysozyme, *J. Biol. Chem.* 250 (17) (1975) 6977-6982
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P.**, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 5. Auflage (1999)
- Vang, O., Larsen, K.P., Bog-Hansen, T.C.**, A new quantitative and highly specific assay for lectin binding activity, in: Bog-Hansen, T.C., van Driessche, E. (Hrsg.), *Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry*, Walter de Gruyter Verlag Berlin (1986) 637-644
- Verband Forschender Arzneimittel e.V. (VFA)**,  
[http://www.vfa.de/de/forschung/am\\_entwicklung/amzulassungen\\_gentec.html](http://www.vfa.de/de/forschung/am_entwicklung/amzulassungen_gentec.html) (2006)
- Violand, B. N., Siegel, N. R.**, Protein and peptide chemical and physical stability, in Reid, R. E. *Peptide and protein drug analysis*, Marcel Dekker Inc. New York 2000
- Vogel, W.**, *Glaschemie*, Springer Verlag Berlin, 3. Auflage (1992)
- Vroman, L., Adams, A. L., Klings, M., Fischer, G. C., Munoz, P. C., Solensky, R. P.**, Reactions of formed elements of blood with plasma proteins at interfaces, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 283 (1977) 65-76
- Wagner, H., Jordan, E., Feil, B.**, Studies on the standardization of mistletoe preparations, *Oncology* 43 (1) (1986) 16-22
- Wang, W.**, Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *Int J Pharm* 185 (2) (1999) 129-188
- Wang, W.**, Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, *Int J Pharm* 289 (1-2) (2005) 1-30
- Wätzig, H., Degenhardt, M., Kunkel, A.**, Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications, *Electrophoresis* 19 (16-17) (1998) 2695-2752
- Wätzig, H.**, Statistik in der Pharmazeutischen Analytik, *PZ Prisma* 4 (2002) 240-244
- Welfle, H.**, Optische Spektroskopie, in: Holtzhauer, M. (Hrsg.), *Methoden in der Proteinanalytik*, Springer-Verlag Berlin (1996)
- Winter, R., Noll, F.**, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner Stuttgart (1998)

- Witthohn, K.**, Chemische Standardisierung von Mistelextraktzubereitungen als Voraussetzung für den Nachweis der Wirksamkeit, in: Loew, D., Rietbrock, N. (Hrsg.), *Phytopharmaka II: Forschung und klinische Anwendung*, Steinkopff Verlag Darmstadt (1996) 186-195
- Woody, R. W.**, Circular dichroism of peptides and proteins, in: Nakanishi, K., Berova, N., Woody, R. W. (Hrsg.), *Circular dichroism. Principles and applications*, VCH Publishers, Inc. New York (1994) 473-521
- Wu, A. M., Song, S. C., Hwang, P. Y., Wu, J. H., Pfuller, U.**, Interaction of mistletoe toxic lectin-I with sialoglycoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214 (2) (1995) 396-402
- Yang, Y., Hamaguchi, K.**, Hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl N-Acetyl-chitotrioside catalyzed by hen and turkey lysozymes. pH dependence of the kinetics constants, *J. Biochem.* 87 (4) (1980) 1003-1014
- Zimmer, A.**, Problem Arzneistoffstabilität. Galenische Formulierung rekombinanter Wirkstoffe, *Pharm. Unserer Zeit* 32 (5) (2003) 384-389
- Zubay, G.**, *Biochemie*, Brandt, U., Schägger, H. (Hrsg.), McGraw-Hill Publishing International (UK) 4. Auflage (2000)

## 8 Anhang

Tabelle 8-1: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in rein wässriger bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
Zeit	Type I plus®	Type I plus® silikonisiert	Typ I-Glas	Topas®	Topas® silikonisiert
0	75,56 $\pm$ 0,45	75,56 $\pm$ 0,45	75,56 $\pm$ 0,45	75,56 $\pm$ 0,45	75,56 $\pm$ 0,45
7	75,13 $\pm$ 1,28	75,63 $\pm$ 1,18	75,38 $\pm$ 1,83	76,45 $\pm$ 0,75	74,48 $\pm$ 1,26
14	74,3 $\pm$ 1,03	74,27 $\pm$ 1,27	74,8 $\pm$ 1,34	76,95 $\pm$ 0,43	72,94 $\pm$ 0,69

Tabelle 8-2: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in wässriger 1,2 % NaCl-Lösung bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
Zeit	Type I plus®	Type I plus® silikonisiert	Typ I-Glas	Topas®	Topas® silikonisiert
0	88,6 $\pm$ 1,41	88,6 $\pm$ 1,41	88,6 $\pm$ 1,41	88,6 $\pm$ 1,41	88,6 $\pm$ 1,41
7	89,1 $\pm$ 0,68	87,31 $\pm$ 0,15	83,06 $\pm$ 1,3	88,06 $\pm$ 2,13	89,68 $\pm$ 1,52
14	88,82 $\pm$ 0,22	87,42 $\pm$ 1,98	82,1 $\pm$ 1,74	88,33 $\pm$ 0,08	88,82 $\pm$ 0,3

Tabelle 8-3: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in wässriger 0,9 % NaCl-Lösung bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
Zeit	Type I plus®	Type I plus® silikonisiert	Typ I-Glas	Topas®	Topas® silikonisiert
0	87,17 $\pm$ 0,38	87,17 $\pm$ 0,38	87,17 $\pm$ 0,38	87,17 $\pm$ 0,38	87,17 $\pm$ 0,38
7	86,95 $\pm$ 0,69	87,85 $\pm$ 0,88	87,78 $\pm$ 3,39	89,03 $\pm$ 1,98	88,76 $\pm$ 1,14
14	87,67 $\pm$ 0,69	89,39 $\pm$ 0,43	87,85 $\pm$ 2,26	87,31 $\pm$ 1,12	88,55 $\pm$ 0,84

Tabelle 8-4: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in wässriger 0,45 % NaCl-Lösung bei Lagerung in verschiedenen Primärpackmitteln (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
Zeit	Type I plus <sup>®</sup>	Type I plus <sup>®</sup> silikonisiert	Typ I-Glas	Topas <sup>®</sup>	Topas <sup>®</sup> silikonisiert
0	91,4 $\pm$ 0,56	91,4 $\pm$ 0,56	91,4 $\pm$ 0,56	91,4 $\pm$ 0,56	91,4 $\pm$ 0,56
7	91,58 $\pm$ 1,3	90,86 $\pm$ 1,12	91,2 $\pm$ 0,7	89,53 $\pm$ 0,45	89,53 $\pm$ 4,79
14	90,75 $\pm$ 1,9	91,47 $\pm$ 1,38	90,8 $\pm$ 0,34	89,46 $\pm$ 3,35	90,5 $\pm$ 4,03

Tabelle 8-5: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in rein wässriger Lösung bei Lagerung mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
Zeit	ohne Zusatz <sup>®</sup>	mit Glas	mit Topas <sup>®</sup>
0	85,86 $\pm$ 2,36	86,02 $\pm$ 4,61	87,03 $\pm$ 1,67
7	85,59 $\pm$ 1,22	81,29 $\pm$ 1,52	87,28 $\pm$ 0,87
14	84,05 $\pm$ 2,53	78,42 $\pm$ 2,69	87,35 $\pm$ 0,82

Tabelle 8-6: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 5,5 bei Lagerung mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
Zeit	ohne Zusatz <sup>®</sup>	mit Glas	mit Topas <sup>®</sup>
0	104,3 $\pm$ 1,1	104,4 $\pm$ 0,4	102,2 $\pm$ 5,1
7	103,7 $\pm$ 2,0	103,8 $\pm$ 3,7	106,7 $\pm$ 1,3
14	104,2 $\pm$ 1,8	104,2 $\pm$ 2,0	105,9 $\pm$ 1,4

Tabelle 8-7: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 4,5 bei Lagerung mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
Zeit	ohne Zusatz <sup>®</sup>	mit Glas	mit Topas <sup>®</sup>
0	107,0 $\pm$ 0,6	102,0 $\pm$ 5,6	103,0 $\pm$ 0,4
7	105,4 $\pm$ 0,5	99,7 $\pm$ 6,3	103,5 $\pm$ 3,1
14	100,2 $\pm$ 6,4	68,4 $\pm$ 7,3	103,1 $\pm$ 3,6

Tabelle 8-8: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 6,5 bei Lagerung mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
Zeit	ohne Zusatz <sup>®</sup>	mit Glas	mit Topas <sup>®</sup>
0	97,0 $\pm$ 3,4	101,3 $\pm$ 0,7	98,9 $\pm$ 1,8
7	102,0 $\pm$ 0,7	102,8 $\pm$ 3,3	99,3 $\pm$ 0,8
14	102,1 $\pm$ 0,4	98,4 $\pm$ 1,1	100,1 $\pm$ 0,2

Tabelle 8-9: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in Phosphatpuffer pH 7,4 bei Lagerung mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
Zeit	ohne Zusatz <sup>®</sup>	mit Glas	mit Topas <sup>®</sup>
0	102,6 $\pm$ 3,6	94,2 $\pm$ 2,1	94,2 $\pm$ 2,2
7	96,8 $\pm$ 0,6	20,0 $\pm$ 1,1	94,8 $\pm$ 0,9
14	95,6 $\pm$ 1,1	14,7 $\pm$ 1,0	95,5 $\pm$ 0,5

Tabelle 8-10: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke bei Lagerung mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

		Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
System	Zeit	ohne Zusatz®	mit Glas	mit Topas®
<b>1,2 % NaCl</b>	0	68,1 $\pm$ 5,8	67,5 $\pm$ 6,1	76,0 $\pm$ 1,0
	7	68,0 $\pm$ 4,9	77,0 $\pm$ 1,8	75,4 $\pm$ 1,0
	14	65,3 $\pm$ 4,3	73,8 $\pm$ 1,3	76,2 $\pm$ 1,5
<b>0,9 % NaCl</b>	0	90,5 $\pm$ 0,6	92,2 $\pm$ 1,3	91,4 $\pm$ 0,8
	7	92,4 $\pm$ 1,5	91,4 $\pm$ 1,6	88,2 $\pm$ 1,0
	14	92,6 $\pm$ 1,9	89,4 $\pm$ 1,9	88,9 $\pm$ 5,1
<b>0,45 % NaCl</b>	0	85,05 $\pm$ 4,2	85,34 $\pm$ 5,6	90,5 $\pm$ 1,43
	7	85,2 $\pm$ 4,06	80,11 $\pm$ 3,93	90,54 $\pm$ 0,54
	14	85,99 $\pm$ 2,98	77,99 $\pm$ 1,65	90,11 $\pm$ 1,73
<b>0,1125 % NaCl</b>	0	88,9 $\pm$ 0,7	85,9 $\pm$ 2,4	83,5 $\pm$ 1,3
	7	82,2 $\pm$ 0,0	75,0 $\pm$ 1,7	84,4 $\pm$ 0,8
	14	86,8 $\pm$ 2,3	61,1 $\pm$ 4,9	82,5 $\pm$ 1,8

Tabelle 8-11: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in Lösungen unterschiedlicher Polysorbat 80-Konzentration bei Lagerung mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

		Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
System	Zeit	ohne Zusatz®	mit Glas	mit Topas®
<b>0,1 % Polysorbat</b>	0	86,7 $\pm$ 1,4	89,7 $\pm$ 2,2	85,7 $\pm$ 2,1
	7	90,1 $\pm$ 3,7	88,0 $\pm$ 5,0	87,2 $\pm$ 2,4
	14	92,6 $\pm$ 2,8	73,5 $\pm$ 2,4	84,6 $\pm$ 1,5
<b>0,05 % Polysorbat</b>	0	72,7 $\pm$ 1,4	69,7 $\pm$ 2,2	71,7 $\pm$ 2,5
	7	71,5 $\pm$ 2,7	55,6 $\pm$ 5,0	70,9 $\pm$ 2,4
	14	71,7 $\pm$ 2,8	50,9 $\pm$ 3,9	71,4 $\pm$ 3,8
<b>0,01 % Polysorbat</b>	0	64,7 $\pm$ 3,3	60,6 $\pm$ 0,6	62,0 $\pm$ 3,1
	7	64,5 $\pm$ 0,6	59,2 $\pm$ 3,1	61,3 $\pm$ 2,2
	14	63,7 $\pm$ 2,0	35,88 $\pm$ 1,5	62,1 $\pm$ 1,7

Tabelle 8-12: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in 0,001 % Poloxamer 407-Lösung bei Lagerung mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
Zeit	ohne Zusatz <sup>®</sup>	mit Glas	mit Topas <sup>®</sup>
0	92,0 $\pm$ 0,9	91,8 $\pm$ 0,5	91,7 $\pm$ 1,6
7	91,8 $\pm$ 1,9	83,0 $\pm$ 1,0	93,5 $\pm$ 0,5
14	94,1 $\pm$ 1,2	78,2 $\pm$ 1,6	93,7 $\pm$ 0,6

Tabelle 8-13: Ermittelte Lysozymkonzentration (0,1 mg/ml) in 0,025 % PVP-Lösung bei Lagerung mit und ohne Topas<sup>®</sup>- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
Zeit	ohne Zusatz <sup>®</sup>	mit Glas	mit Topas <sup>®</sup>
0	97,7 $\pm$ 3,8	92,0 $\pm$ 0,3	83,5 $\pm$ 0,9
7	85,7 $\pm$ 1,1	91,8 $\pm$ 1,7	88,2 $\pm$ 1,1
14	84,4 $\pm$ 0,5	82,5 $\pm$ 1,4	86,1 $\pm$ 2,5



Tabelle 8-14: Bestimmung verschiedener Lysozymkonzentration in rein wässriger Lösung bei Lagerung mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

		Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
System	Zeit	ohne Zusatz®	mit Glas	mit Topas®
<b>0,1 mg/ml</b>	0	85,86 $\pm$ 2,36	86,02 $\pm$ 4,61	87,03 $\pm$ 1,67
	7	85,59 $\pm$ 1,22	81,29 $\pm$ 1,52	87,28 $\pm$ 0,87
	14	84,05 $\pm$ 2,53	78,42 $\pm$ 2,69	87,35 $\pm$ 0,82
<b>0,075 mg/ml</b>	0	74,05 $\pm$ 0,87	68,6 $\pm$ 0,0	76,34 $\pm$ 2,28
	7	72,83 $\pm$ 0,31v	44,84 $\pm$ 2,83	72,47 $\pm$ 3,8
	14	72,83 $\pm$ 0,5	35,52 $\pm$ 0,33	73,33 $\pm$ 1,37
<b>0,05 mg/ml</b>	0	37,13 $\pm$ 0,4	34,7 $\pm$ 0,54	37,97 $\pm$ 0,86
	7	38,55 $\pm$ 0,79	21,9 $\pm$ 0,31	37,35 $\pm$ 0,35
	14	38,12 $\pm$ 0,71	17,37 $\pm$ 1,91	37,62 $\pm$ 1,59
<b>0,025 mg/ml</b>	0	27,2 $\pm$ 0,52	16,93 $\pm$ 0,86	26,02 $\pm$ 0,96
	7	27,03 $\pm$ 0,8	6,57 $\pm$ 1,13	24,12 $\pm$ 0,71
	14	27,38 $\pm$ 1,43	2,08 $\pm$ 0,16	22,77 $\pm$ 2,27

Tabelle 8-15: Bestimmung verschiedener Lysozymkonzentration in wässriger 0,45 % Natriumchloridlösung bei Lagerung mit und ohne Topas®- bzw. Glaszusatz (n=6). Die Lagerzeit beträgt 14 Tage.

		Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
System	Zeit	ohne Zusatz®	mit Glas	mit Topas®
<b>0,1 mg/ml</b>	0	85,05 $\pm$ 4,2	85,34 $\pm$ 5,6	90,5 $\pm$ 1,43
	7	85,2 $\pm$ 4,06	80,11 $\pm$ 9,93	90,54 $\pm$ 0,54
	14	85,99 $\pm$ 2,98	77,99 $\pm$ 1,65	90,11 $\pm$ 1,73
<b>0,075 mg/ml</b>	0	69,05 $\pm$ 0,68	62,72 $\pm$ 4,18	70,5 $\pm$ 0,71
	7	67,98 $\pm$ 0,77v	52,94 $\pm$ 5,12	70,59 $\pm$ 0,51
	14	68,29 $\pm$ 1,97	46,97 $\pm$ 2,67	71,32 $\pm$ 0,97
<b>0,05 mg/ml</b>	0	39,37 $\pm$ 0,33	37,6 $\pm$ 0,54	37,48 $\pm$ 0,73
	7	38,1 $\pm$ 0,26	28,5 $\pm$ 3,46	39,78 $\pm$ 0,55
	14	37,57 $\pm$ 0,78	13,5 $\pm$ 0,99	39,43 $\pm$ 0,77
<b>0,025 mg/ml</b>	0	28,03 $\pm$ 0,91	12,3 $\pm$ 1,05	26,87 $\pm$ 1,14
	7	28,82 $\pm$ 2,01	13,55 $\pm$ 1,13	27,73 $\pm$ 1,77
	14	28,95 $\pm$ 0,56	9,58 $\pm$ 0,39	28,73 $\pm$ 1,29